

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. D. Cremer

Studien zur Frage der Toxizität
peroraler Cyclamatgaben an der Ratte
sowie Untersuchungen der Nährstoffverwertung
nach Cyclamatzufuhr

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
István Valach
Tierarzt aus Wanlo

Gießen 1969

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. H. D. Cremer

Studien zur Frage der Toxizität
peroraler Cyclamatgaben an der Ratte
sowie Untersuchungen der Nährstoffverwertung
nach Cyclamatzufuhr

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

eingereicht von
István Valach
Tierarzt aus Wanlo

Gießen 1969

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Giessen



Dekan: Prof. Dr. H. Tillmann

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Hofmann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dez. 1969

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung und Themastellung	1
B. Versuchsmethodik	8
I. Versuchstiere	8
II. Zusammensetzung der Versuchskost	8
III. Versuchstierhaltung	10
IV. Testmethode (Kriterien und statistische Bearbeitung)	11
C. Versuchsbeschreibung und Versuchsergebnisse	14
Versuch I	14
Versuch II	27
D. Akute Giftwirkung durch hoher Cyclamatdosen	38
E. Diskussion der Versuchsergebnisse	42
F. Zusammenfassung	51
G. Tabellenanhang	52
H. Literaturverzeichnis	54

A. EINLEITUNG UND THEMASTELLUNG

Die künstlichen Süßstoffe werden besonders in Notzeiten und von ärmeren Bevölkerungsschichten als Zuckerersatz verwendet, weil sie als Süßungsmittel billiger als Saccharose sind.

Ein vollständiges oder teilweises Verbot von Saccharose ist in der Diätetik in manchen Fällen notwendig (A) oder wird oft angeraten (B).

A) Erkrankungen, bei denen die Therapie u.a. darin besteht, die Aufnahme von Saccharose zu reduzieren bzw. keinen Rohrzucker zu verzehren sind:

1. Diabetes
2. Saccharose-Intoleranz
3. Fructose-Intoleranz

B) Bedingungen, bei denen eine reduzierte Aufnahme von Saccharose oft angeraten wird sind:

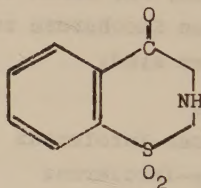
1. Vermeidung einer "Nährstoffverdünnung" durch "leere" Calorien bei Personen mit geringem Calorienverbrauch.
2. Prophylaxe der sogenannten Zivilisationskrankheiten
 - a) Caries
 - b) cardiovasculäre Erkrankungen
 - c) Diabetes
 - d) Übergewicht und Folgeerkrankungen
3. Ketogene Kostformen als therapeutische Maßnahme (Epilepsie).

Es soll hier nicht diskutiert werden, ob die Empfehlung, den Zucker zu meiden oder den Verbrauch wenigstens einzuschränken, im Einzelfall zu Recht ausgesprochen wurde oder nicht. Es ist auch nicht entscheidend, ob sich das Verbot gegen den Zucker selbst richtet wegen einer speziellen Unverträglichkeit (Saccharose-

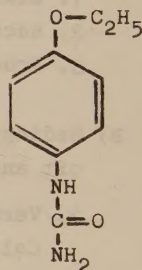
Intoleranz), oder ob die Saccharose eine ungünstige Eigenschaft mit anderen Bestandteilen von Nahrungsmitteln teilt, also beispielsweise die Anlieferung von Glucose oder ganz allgemein von Calorien. Jedenfalls geht aber die erforderliche oder unnötige Meidung von Saccharose mit dem teilweisen oder vollständigen Verlust der Geschmacksqualität "süß" einher, der von zahlreichen Menschen nur ungern ertragen wird. Zur Substituierung werden dann Süßstoffe herangezogen. Ein Zwang zu ihrer Verwendung besteht nicht.

Die bekanntesten Süßstoffe sind:

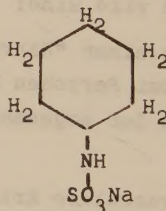
Saccharin (Benzoessäuresulfimid)



Dulcin (p-Phenetolcarbamid)



Cyclamate (Cyclohexylsulfamate)



Im Verlauf des zweiten Weltkrieges wurden neue Süßstoffe entwickelt (Ultrasüß, Duoxan), aber danach blieben Saccharin und Dulcin die einzigen künstlichen Süßstoffe, die wirtschaftliche Bedeutung hatten. Das Saccharin hat einen 300 - 500 (450)-fachen und das Dulcin einen 150 - 250 (200)-fachen Süßungsgrad gegenüber Saccharose (9, 10, 19, 24, 25).

Hinsichtlich der praktischen Verwendbarkeit bestehen gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Süßstoffen. Saccharin ist

nicht koch- und backbeständig, Dulcin kann nur als beschränkt koch- und backbeständig angesehen werden. Die Zersetzungsprodukte von Dulcin und auch von Saccharin sind geschmacklos. Saccharin besitzt oberhalb einer Konzentration von 1 % einen deutlich unangenehm, bitteren Beigeschmack. Diese Eigenschaft wird vom Toxikologen als wertvoll angesehen, da hierdurch Überdosierung, praktisch völlig vermieden werden. Tatsächlich kennen wir auf Grund einer Erfahrung von weit mehr als einem halben Jahrhundert keinen einzigen Fall einer "echten" Saccharinvergiftung. Dulcin ist schlecht wasserlöslich, aber ohne unangenehmen Beigeschmack. Durch die Lebensmittelgesetzgebung und hier speziell durch das Süßstoffgesetz ist jedoch die Anwendung von Dulcin weitgehend beschränkt.

Ebenfalls ohne Nebengeschmack bei üblicher Dosierung sind die Cyclamate, deren Süßkraft von SVEDA 1937 entdeckt wurde (1, 11, 19, 24, 25). Mit der Sammelbezeichnung "Cyclamate" charakterisiert man die Cyclohexylsulfaminsäure ($C_6H_{11}NHSO_3H$) und ihre Natrium- und Calciumsalze (2, 5, 6, 7, 11, 25, 39). Seit 1950 werden diese Substanzen von den ABBOT-Laboratorien als künstlicher Süßstoff hergestellt (11, 16, 34, 40). Das Cyclohexylsulfamat und dessen Na- und Ca-Salze gelten neben Saccharin als am meisten hergestellte und vertriebene Süßstoffe, sie sind in den USA und seit 1963 auch in der BRD gesetzlich zugelassen (8, 12, 13, 19, 40). Die Cyclohexylsulfaminsäure zählt zu den starken Säuren und schmilzt bei $170^{\circ}C$ ohne Zersetzung. Ihre Salze (Na- und Ca-) können auf mindestens $500^{\circ}C$ erhitzt werden ohne Zersetzung. Sie sind starke Elektrolyte. Die Säure und auch die Salze sind gut wasserlöslich und lösen sich auch in verdünntem Alkohol. Sie sind beständig gegen Temperatureinwirkung, Licht und Luftsauerstoff im pH-Bereich zwischen 2 - 10 (19). Im allgemeinen wird angegeben, daß Cyclamate in Lösung bis zu 0.17 % 30-fach süßer als Saccharose sind (11, 33, 40). Gegenüber Saccharin beträgt ihre Süßkraft jedoch nur etwa 1/10.

Das Dulcin ruft bereits in niedrigeren Konzentrationen Verdauungsstörungen hervor, und es wird dem Dulcin eine kumulative toxische Wirkung zugeschrieben (10, 19). Daher ist Dulcin in den USA verboten und in der Bundesrepublik wie schon erwähnt gesetzlich nur beschränkt zugelassen.

Auf Grund jahrzehntelanger praktischer Anwendung und zahlreicher gezielter Untersuchungen gilt die Verwendung von Saccharin allgemein als physiologisch unbedenklich. Die Cyclamate werden dagegen erst seit einigen Jahren als Süßstoffe verwendet. Über mögliche Nebenwirkungen ist daher aufgrund der Erfahrung wenig auszusagen. Es gibt auch nur wenige experimentelle Arbeiten zu diesem Thema (14, 17, 25).

Es wird immer häufiger die Forderung erhoben, das Wissen um die physiologischen Wirkungen der Cyclamate durch weitere Untersuchungen zu vermehren, da diese Süßungsmittel nicht nur von Diabetikern, sondern auch von anderen Bevölkerungsgruppen unter Umständen über Jahrzehnte oder ein Leben lang verwendet werden (15, 18, 20, 28, 31). Die Frage wurde insbesondere deshalb aktuell, da in den USA, England, Frankreich, Deutschland und anderen Staaten der Cyclamatverbrauch sprunghaft anstieg und keinesfalls eindeutig abgeklärt war, ob die Cyclamate, besonders bei ihrer chronischen Zufuhr absolut untoxisch wären. Einen Begriff von dem sprunghaften Anwachsen des Cyclamatverbrauchs erhält man, wenn man hört, daß von diesem Süßstoff allein 1968 17 Millionen Pfund in den USA verbraucht wurden. Dazu kam die Tatsache, daß man in mehreren Ländern begann, die sogenannten "soft drinks" (dies sind die alkoholfreien Getränke wie Coca-Cola, Grapefruit-saft usw.) mit Cyclamat zu süßen. Hier erschien ganz besonders das Kind bedroht, das bekanntlich an einem heißen Sommertag ohne weiteres mehr als 1 Liter derartiger cyclamat-gesüßter Getränke zu sich nehmen kann. Wir wissen, daß in den USA im Jahre 1968 allein 490 Millionen Kisten cyclamathaltiger "soft drinks" in den Handel gebracht wurden.

Die Frage nach der Toxizität der Cyclamate wird weiterhin besonders akut durch die Tatsache, daß diese Süßstoffe koch- und backfest sind, so daß sie mehr und mehr im Haushalt (insbesondere der amerikanischen Frauen) eine Rolle zu spielen begannen, wobei die Süßung der Speisen oder des Backteiges mit Hilfe einer Cyclamatlösung erfolgte, die aus einer Spritzflasche zugegeben wurde.

Nun besitzt leider die Gruppe der Cyclamate nicht die Eigenschaft des Saccharins, das in einer Konzentration von mehr als 1 % stark bitter schmeckt (wodurch eine Überdosierung automatisch ausgeschlossen wurde). Cyclamate schmecken in höheren Konzentrationen schwach metallisch, in Fruchtsäften kann man gar keinen Nebengeschmack feststellen, wodurch die Möglichkeit einer evtl. ungewollten Überdosierung gegeben ist, die insbesondere bei einem chronischen Gebrauch von Cyclamat die Gefahr einer gesundheitlichen Schädigung in sich birgt.

Schließlich kommt noch dazu, daß sich Eis-Krem (ice-creams) mit Hilfe von Cyclamaten sehr viel leichter herstellen läßt als mit Zucker, da der Erstarrungspunkt sehr viel höher als bei einem zuckerhaltigen Eis liegt. Ein weiterer nicht unwichtiger Punkt für unkontrollierbare Zufuhr dieser Süßstoffe, geeignet, bei chronischem Gebrauch zu evtl. gesundheitlichen Schäden zu führen.

Auf Grund dieser nicht ungefährlichen Gesamtsituation, die gegeben war durch die immer mehr zunehmende Anwendung eines Süßstoffes, über dessen physiologisch-toxikologische Eigenschaften wir noch zu wenig wissen, war es notwendig hier weiter zu arbeiten.

Die Aufgabe der vorliegenden Dissertation war zunächst eine Studie der akut toxischen sowie der chronisch toxischen Wirkung der Cyclamate durchzuführen sowie in weiteren Versuchen zu unter-

suchen, in welcher Weise die Nährstoffverwertung durch Cyclamat beeinflußt wird.

Im ersten Teil dieser Arbeit gingen wir von den Untersuchungen von NEES und DERSE (32) aus, die gefunden hatten, daß bei einem Gehalt der Versuchskost von 10 % Calciumcyclamat die Tiere gegenüber Kontrolltieren ohne Cyclamat, etwa 10 % mehr Futter aufnahmen. Sie kompensierten also den geringeren Caloriengehalt ihrer Kost durch Mehraufnahme an Futter. Trotzdem wuchsen sie 20 - 30 % weniger als die Kontrolltiere. Auch die Gruppen mit 5 % Cyclamat im Futter zeigten eine geringere Wachstumsintensität als die Vergleichsratten.

Aus den Versuchen von NEES und DERSE ergibt sich somit, daß die Cyclamataufnahme zu einer schlechteren Nahrungsverwertung geführt hat. Von uns sollte mit einer spezielleren Versuchstechnik untersucht werden, ob die Aufnahme von Cyclamaten tatsächlich zu einer schlechteren Verwertung der Nahrung führt, wenn ja, ab welcher Dosierung.

Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die Aufnahme von Cyclamaten den Bedarf an Vitaminen der B-Gruppe beeinflußt. Daß Cyclamate den Bedarf an B-Vitaminen beeinflussen könnten, ergibt sich aus folgenden Überlegungen:

- a) Cyclamate erhöhen die Wasseraufnahme (32), was zu stärkeren Aufschwemmungsverlusten von wasserlöslichen B-Vitaminen mit dem Urin führen könnte (27, 35).
- b) Cyclamate beeinflussen die osmotischen Verhältnisse in den unteren Darmabschnitten und bewirken durch ihre laxierende Wirkung die Anlieferung von nicht resorbierten Nährstoffen in tiefere Abschnitte des Verdauungskanals. Dadurch könnte eine Verschiebung in der Zusammensetzung der intestinalen Darmflora bewirkt werden, was wiederum einen Einfluß auf die enterale Vitaminsynthese haben kann. Auf diesem Wege beein-

flussen Sorbit und schwerverdauliche Kohlenhydrate die enterale Vitaminsynthese und damit den Bedarf an B-Vitaminen. Es kann über eine Beeinflussung der Darmflora auch zu einer bakteriellen Festlegung von Vitaminen kommen, wenn durch Resorptionsstörungen Vitamine in den distalen Teil des Verdauungskanals gelangen.

(Eine direkte Beeinflussung des Vitaminbedarfs durch die Cyclamataufnahme infolge Blockierung oder Zerstörung von Vitaminen oder durch Verbrauch von Vitaminen als Enzymbestandteil für Entgiftungsreaktionen ist kaum anzunehmen, da die Cyclamate als stoffwechsellinert gelten).

B. VERSUCHSMETHODIK

I. Versuchstiere

Es wurden wachsende männliche weiße Ratten (Stamm Royal-Wistar⁺) verwendet. Auf weibliche Tiere wurde verzichtet, da diese im Versuch höhere Streuungen aufweisen (29). Die Tiere wogen bei der Ankunft 33.0 und 53.0 g.

Zu den Versuchen wurden die Tiere nach Gewichten randomisiert. Nach Aufteilung in Gruppen hatten diese ein Durchschnittsgewicht von 60.5 - 61.0 g (Versuch I) und 56.6 - 56.9 g im Versuch II.

Das Cyclamat wurde als Mischung von Ca- und Na-Cyclamat *ana partes aequalis* dem Futter zugemischt.

II. Zusammensetzung der Versuchskost

Die verwendete halbsynthetische Kost enthielt je 100 g:

- 60.0 g Saccharose (feine Raffinade, zur Hälfte gemahlen)
- 20.0 g Casein (vitaminfrei⁺⁺)
- 7.0 g Schweineschmalz (darin die fettlöslichen Vitamine A, D und E)
- 5.8 g Reisstärke (DAB 6)
- 4.0 g Mineralstoffmischung (pulverisiert)
- 2.0 g Reisstärke (DAB 6), darin jeweilige Mischung von B-Vitaminen
- 0.2 g Methionin mit 0.8 g Reisstärke gemischt
- 0.2 g Cholinchlorid

⁺) Züchter: Meyer-Arend, Bad Salzufflen

⁺⁺) Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio, USA

Bei der Vitaminierung wurden flüssigem Schweineschmalz auf 7 g folgende Mengen der fettlöslichen Vitamine zugesetzt:

Vitamin A (als Palmitat)	1000 I.E.
Vitamin D (D_2 ölig)	130 I.E.
Vitamin E (DL Tocopherolacetat)	10 mg

Die Mineralstoffmischung (USP XIII, 2) wurde in folgender Weise hergestellt:

- Lösen von 222 g Zitronensäure in 500 ml heißem dest. Wasser,
- vormischen mit 269 g $CaCO_3$, 57.8 g $MgCO_3$ (40 % MgO), 68.4 g Na_2CO_3 (wasserfrei), 282.6 g K_2CO_3 (vorher bei $150^\circ C$ getrocknet),
- hinzufügen der vorher in dest. Wasser in folgender Menge gelösten Spurenelemente: 40.0 mg KJ, 234.0 mg $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$, 124.0 mg NaF, 88.0 mg $KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$.
- Zugabe von 14.88 g Eisencitrat (17.5 % Fe), das in 296.6 g HCl (36 %ig) aufgelöst worden war,
- verrühren mit 19.2 g Schwefelsäure (96 %ig) und 10 ml dest. Wasser, dem 238.6 g H_3PO_4 (86.5 %ig) zugegeben worden waren.

Die Lösung wurde bis zum Abklingen der Kohlensäurebildung intensiv gerührt, in flache Glasschalen ausgegossen, bei $95^\circ C$ 24 Std. lang getrocknet und anschließend mit einer Mühle fein gemahlen.

Die B-Vitamin-Mischungen wurden nach HÖTZEL (23) hergestellt:

Vitamine je 100 g Futter in mg:	I	II
Thiamin	0.2	0.2
Riboflavin	0.3	0.3
Pyridoxin	0.3	0.3
Pantothensäure	1.0	1.0
Inosit	4.0	4.0
Cobalamin	0.0008	0.0008

Vitamine je 100 g Futter in mg:	I	II
Niacin	-	3.0
PAB	-	6.0
Biotin	-	0.02
Folsäure	-	0.04
Menadion	-	0.015
Ascorbinsäure	-	10.0

Die Vitaminmischung I enthält alle für die weiße Versuchsratte essentiellen B-Vitamine, die Vitaminmischung II darüber hinaus auch noch diejenigen B-Vitamine, auf deren Zufuhr mit der Kost Ratten nicht angewiesen sind, weiterhin Menadion und Ascorbinsäure. Das Mischen des Versuchsfutters erfolgte in einem Spezial-Futtermischer⁺⁾ .

Neben der vorstehend beschriebenen Kost wurde auch Altromin-R⁺⁺⁾ verwendet, um festzustellen, ob die Tiere bei gleichzeitiger Gabe von Cyclamaten anders als bei halbsynthetischer Kost reagieren, ob also "natürliche" Kostbestandteile Sonderwirkungen entfalten. Altromin enthält folgende Hauptbestandteile: Gerste, Hafer, Mais, Fisch- und Fleischfuttermehl, sowie Bierhefe, Luzernegrünmehl und Futterknochenschrot, das mit Vitaminen und Mineralstoffen angereichert ist. Cyclamat wurde als Mischung von Calcium- und Natriumcyclamat im Verhältnis 1 : 1 verabreicht.

III. Versuchstierhaltung

Nach der Anlieferung im Alter von 21 Tagen wurden die Rattenmännchen 8 Tage in Gemeinschaftskäfigen (aus Maschendraht) zur

⁺⁾ Lödige-Mischer, Modell M. 20 E.

⁺⁺⁾ Altromin-GmbH Lage (Lippe)

Eingewöhnung gehalten. Sie erhielten in den Massenkäfigen ein Vorfutter, das aus halbsynthetischer Kost und aus gemahlenden Haferflocken im Verhältnis 1 : 1 bestand. Nach der Eingewöhnungszeit wurden die Tiere in Einzelkäfige gesetzt. Die Verteilung auf Versuchsgruppen erfolgte nach den Gewichten der Tiere derart, daß das durchschnittliche Gewicht und die Streuung der Körpergewichte bei den einzelnen Gruppen möglichst gleich groß waren. Während des Versuchs wurde das Gewicht der Tiere jeweils im Abstand von sieben Tagen festgestellt.

Nur bei Haltung in Einzelkäfigen kann der Futter- und Wasserverbrauch des einzelnen Tieres festgestellt werden. Die Ermittlung der Gewichtszunahmen und die Kontrolle des Allgemeinbefindens kann bei Einzelhaltung leichter erfolgen. Die Käfigstellung wurde regelmäßig gewechselt, damit eine gleichmäßige Lichteinwirkung auf die Versuchstiere erfolgen konnte. Die Tiere wurden jeden Tag gefüttert und mit frischem Wasser versorgt. In die Futternäpfe wurde Maschendraht hineingelegt, um das Verstreuen des Futters zu vermeiden. Die Temperatur lag zwischen 23 - 27° C. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 60 - 75 %. Der Versuchsterraum war vollklimatisiert.

IV. Testmethode (Kriterien und statistische Bearbeitung)

Als Versuchskriterien wurden herangezogen:

Gewichtszuwachs, Futterverzehr, Futterwirkungsverhältnis ($\frac{\text{Gewichtszuwachs}}{\text{Futterverbrauch}}$), Trinkwasseraufnahme, Hb-Gehalt, Überlebensrate ($\frac{\text{erlebte Versuchstage}}{\text{Gesamtversuchstage}} \times 100$), Sektionsbefund (makroskopisch), Organgewichte, mikroskopischer Sektionsbefund.

Im Versuch I wurde der Frage nachgegangen, ob Wechselbeziehungen zwischen B-Vitaminen und der Wirkung von Cyclamaten bestehen. Dabei fand die Vitaminmischung I Verwendung, die bei voller Gabe (100 %) den Bedarf der wachsenden Ratte an B-Vitaminen gerade deckt. Durch Verringerung der Menge von Vitaminmischung I kann ein abgestufter Mangel an allen B-Vitaminen gleichzeitig herbeigeführt werden. Vitaminmischung II enthält neben den Vitaminen der Mischung I auch solche, auf deren Zufuhr mit dem Futter Ratten unter Normalbedingungen nicht angewiesen sind, weil sie entweder in ausreichendem Umfang enteral synthetisiert oder für die Ratte nicht essentiell sind (Ascorbinsäure). Die Vitaminmischung II wird den positiven Kontrollgruppen mit über den Normalbedarf hinausgehender Vitaminversorgung verabreicht.

Der Futterverzehr wurde 14-tägig ermittelt. Die Bestimmung des Hb-Gehaltes wurde im Versuch I in der Mitte der Versuchsperiode, einmalig, im Versuch II dreimal (Anfang - Mitte - Ende) durchgeführt. Der Hämoglobingehalt wurde im Rattenblut, das durch Stutzen des Schwanzes gewonnen wurde, mit einem Hb-Meter⁺⁾ bestimmt.

Die Tiere des Versuchs I wurden mit Futter und frischem Wasser täglich ad libitum versorgt. Die Tiere des Versuchs II dagegen erhielten ihr Futter in einer etwas modifizierten "paired-feeding" Technik (s. auch Seite 47). Die Versuchsgruppe mit der geringsten Nahrungsaufnahme bestimmte die Futtermenge für alle anderen Gruppen.

Die Wasseraufnahme wurde 19 Tage lang bestimmt und zwar im Anschluß an den eigentlichen Versuch, da hierfür Spezialtrinkgefäße benötigt wurden, deren Verwendung evtl. die übrigen Versuchsergebnisse hätte beeinflussen können. Ansonsten herrschten

⁺⁾ American Optical Company, Instrument Division Buffalo, New York

dieselben Versuchsbedingungen. Die Tiere erhielten das Wasser in einem Spezialbehälter⁺), der die genaue Erfassung der von den Tieren getrunkenen Wassermenge erlaubt.

Alle Versuchstiere, auch die während des Versuchs verendeten, wurden seziert. Die Organe wurden zunächst gewogen und dann auf sichtbare pathologische Veränderungen makroskopisch untersucht.

Die statistische Bearbeitung der ermittelten Werte wurde nach dem t-Test vorgenommen (38). Als Grenzwert für die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $P < 5 \%$ gewählt. Für die statistische Auswertung wurden ebenso wie für die graphischen Darstellungen jeweils nur die überlebenden Tiere einer Gruppe herangezogen.

+) SCHNORR, B.: "Kostzusammensetzung und Trinkwasserbedarf".
Dissertation, Giessen 1961

C. VERSUCHSBESCHREIBUNG UND VERSUCHSERGEBNISSE

Versuch I

Futteraufnahme bei verschiedenen Cyclamat- und Vitamin B-Gaben.

Versuchsbeschreibung

Eine Reihe von Versuchstieren erhielt ein Futter, das alle B-Vitamine in ausreichender Menge enthielt (Versuchsreihe 1), während eine andere Reihe (Versuchsreihe 2) Futter mit suboptimalem Gehalt an B-Vitaminen bekam (65 %). Innerhalb beider Versuchsreihen erhielten die Tiere parallel ansteigende Cyclamatgaben (Tab. 1). Verursacht bei den Mangelgruppen eine gleich hohe Cyclamatzufuhr andere oder unterschiedlich starke Wirkungen (z.B. Beeinflussung der Gewichtszunahme) als bei vollernährten Gruppen (bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe ohne Teststoff), so ist eine Wechselwirkung zwischen Teststoff und B-Vitaminen anzunehmen.

Tab. 1: Versuchsanordnung

Vitaminversorgung	Cyclamatgaben (% im Futter)					
Versuchsreihe 1						
300 % des Bedarfs an allen B-Vitaminen (Vitaminmischung II)	0	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
Versuchsreihe 2						
65 % des Bedarfs an B-Vitaminen (Vita- minmischung I, 65 %)	0	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
Gruppenbezeichnung	K	A	B	C	D	E

Der Versuch dauerte 70 Tage. Jede Tiergruppe bestand aus 15 wachsenden Ratten, die zu Versuchsanfang im Durchschnitt 61.0 g schwer waren. Zur Gewöhnung an Cyclamat erhielten die Tiere in 3 Vorversuchstagen ansteigende Mengen von Cyclamat mit der Kost (halbsynthetisches Grundfutter). Trinkwasser und Futter wurden ad libitum verabreicht. Am Versuchsende wurden die Tiere gewogen und durch Dekapitation getötet. Nach der Sektion wurden die folgenden Organe gewogen und dann makroskopisch und z.T. mikroskopisch untersucht: Leber, Herz, Niere, Lunge, Milz und Caecum (voll und leer).

V Versuchsergebnisse

Tab. 2: Gewichtszunahme von voll- und mangelernährten Ratten bei Belastung mit Cyclamaten

Gruppenbe- zeichnung	vollernährt (Reihe 1)		mangelernährt (Reihe 2)	
	absol.(g)	relativ (%) ¹⁾	absol.(g)	relativ (%)
K	344.7	100.0 $\pm$ 14.3	261.0	100.0 $\pm$ 19.5
A	343.7	99.7 $\pm$ 9.8	279.0	106.9 $\pm$ 13.6
B	360.3	104.5 $\pm$ 7.0	281.0	107.7 $\pm$ 15.9
C	346.5	100.5 $\pm$ 7.2	267.0	102.3 $\pm$ 11.7
D	297.8	86.4 $\pm$ 9.2 ⁺⁺²⁾	232.2	88.9 $\pm$ 14.9
E	190.9	55.4 $\pm$ 12.7 ⁺⁺⁺	138.2	52.9 $\pm$ 10.9 ⁺⁺⁺

1) Gewichtszunahme bezogen auf die Kontrollgruppe ohne Cyclamat = 100 % und $\pm$ Standardabweichung

2) Unterschied zur Kontrollgruppe statistisch gesichert:

$$\begin{aligned} & ++ \quad P < 0.01 \\ & +++ \quad P < 0.001 \end{aligned}$$

Betrachtet man die Cyclamatwirkung auf die Gewichtszunahme von Ratten im Mangel an B-Vitaminen (Tab. 2), so zeigt sich bis zu einer Dosierung von 2 % Cyclamat im Futter eher ein positiver als ein negativer Einfluß. Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant. Höhere Gaben als 2 % Cyclamat vermindern etwa im gleichen Umfang bei mangelernährten wie bei vollernährten Ratten die Gewichtszunahmen. Eine Beziehung zwischen der Cyclamataufnahme und dem Bedarf an B-Vitaminen läßt sich demnach an Hand der Gewichtszunahmen nicht nachweisen.

Die Futteraufnahme der voll- und mangelernährten Ratten bei unterschiedlicher Cyclamatbelastung ist aus Tabelle 3 zu ersehen.

Tab. 3: Futteraufnahme von normal ernährten Ratten im Mangel an B-Vitaminen in Abhängigkeit von der Cyclamataufnahme

Gruppenbezeichnung	vollernährt (Reihe 1) ¹⁾		mangelernährt (Reihe 2)	
	absol.(g)	relativ (%)	absol.(g)	relativ (%)
K	1226.8	100.0 $\pm$ 8.8	986.4	100.0 $\pm$ 13.0
A	1223.2	100.2 $\pm$ 5.6	1042.3	105.6 $\pm$ 11.2
B	1220.4	99.5 $\pm$ 5.1	1022.9	103.7 $\pm$ 12.7
C	1166.4	95.1 $\pm$ 5.8	1057.2	107.1 $\pm$ 8.7
D	990 $\pm$ 4	80.7 $\pm$ 3.5 ⁺⁺⁺²⁾	966.1	97.9 $\pm$ 10.2
E	840.9	68.5 $\pm$ 2.3 ⁺⁺⁺	774.4	78.5 $\pm$ 7.1 ⁺⁺⁺

1) Grundfutterverzehr bezogen auf die Kontrollgruppe ohne Cyclamat = 100 % $\pm$ Standardabweichung

2) Unterschied zur Kontrollgruppe statistisch gesichert:

+++ $P < 0.001$

Vergleicht man die Futteraufnahme der vollernährten Gruppen mit den Tieren im Mangel an B-Vitaminen, so erkennt man, daß die Depression durch die Cyclamataufnahme bei den Mangeltieren weit geringer ist. Bei den vollernährten Tieren wird schon ab 4 % Cyclamat die Futteraufnahme deutlich verringert, bei den Vitaminmangeltieren aber erst ab 8 %. Wie unsere Versuche gezeigt haben, scheint der Gruppe der B-Vitamine aber eine sichere Beeinflussung der Futteraufnahme und des Futterwirkungsverhältnisses (wie wir es noch beschreiben werden) nicht zuzukommen. Die von uns statistisch ermittelten Signifikanzen müßten durch Erhöhung der Versuchstierzahlen in den einzelnen Kollektiven noch weiter studiert werden, bevor wir sicherer Aussagen machen könnten.

Um den Einfluß der Cyclamatverabreichung auf die Futteraufnahme besser zu veranschaulichen, wurden die Ergebnisse auch graphisch dargestellt (Abb. 1).

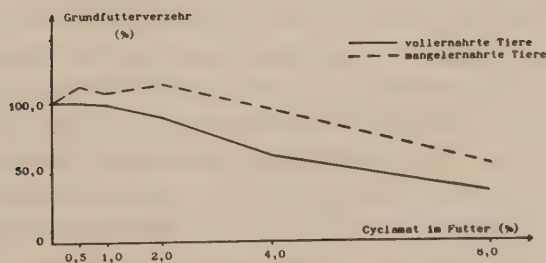


Abb. 1: Die Futteraufnahme von voll- und mangelernährten Gruppen in Abhängigkeit von der Cyclamataufnahme

Tab. 4: Das Futterwirkungsverhältnis von voll- und mangel-
ernährten Gruppen bei Belastung mit Cyclamat

Gruppenbe- zeichnung	vollernährt (Reihe 1)		mangelernährt (Reihe 2)	
	absol.(g)	relativ (%) ¹⁾	absol.(g)	relativ (%)
K	0.28	100.0 $\pm$ 10.7	0.26	100.0 $\pm$ 15.4
A	0.28	100.0 $\pm$ 3.6	0.27	103.8 $\pm$ 19.2
B	0.29	103.5 $\pm$ 7.1	0.27	103.8 $\pm$ 15.4
C	0.29	103.5 $\pm$ 10.7	0.25	96.1 $\pm$ 11.5
D	0.30	107.1 $\pm$ 10.7	0.24	92.3 $\pm$ 11.5
E	0.23	82.1 $\pm$ 3.6 ⁺⁺⁺²⁾	0.18	69.2 $\pm$ 11.6 ⁺⁺⁺

1) Futterwirkungsverhältnis bezogen auf die Kontrollgruppe ohne
Cyclamat = 100 % $\pm$ Standardabweichung

2) Unterschied zur Kontrollgruppe statistisch gesichert:

$$+++ \quad P < 0.001$$

Hinsichtlich des Futterwirkungsverhältnisses reagieren Ratten im Mangel an B-Vitaminen ab 2 % Cyclamat ungünstiger als vollernährte Ratten (vgl. Tab. 4 und Abb. 2). Die Unterschiede hinsichtlich der relativen Futterwirkung zwischen den Gruppen D₁ und D₂ bzw. E₁ und E₂ sind statistisch gesichert $P < 0.01$. Offenbar verstärken sich bei höheren Cyclamatgaben Teststoff und Vitaminmangel gegenseitig in ihrer verdauungs- und resorptionsmindernden Wirkung. In der Tendenz wird das Futterwirkungsverhältnis bei den vollernährten Tieren bis 4 % Cyclamat verbessert. Die Unterschiede lassen sich jedoch statistisch nicht sichern. Festzuhalten ist weiterhin, daß in diesem Versuch erst bei 8 % Cyclamat im Futter eine signifikante Depression der Futterverwertung im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen ohne Cyclamat auftrat.

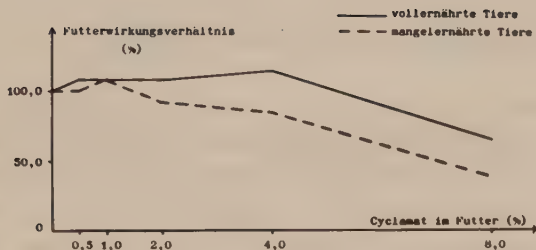


Abb. 2: Futterwirkungsverhältnis in Abhängigkeit von der Cyclamataufnahme bei normalernährten Ratten und solchen im Mangel an B-Vitaminen

Am 56. Versuchstag wurde bei den Kontrollgruppen und den Gruppen mit 8 % Cyclamat im Futter der Hb-Gehalt bestimmt (s. Tab. 5).

Aus der Tabelle 5 ist zu ersehen, daß ein statistisch gesicherter Unterschied ($P < 0.01$) bei den vollernährten Tieren zwischen den Gruppen K_1 (0 %) und E_1 (8.0 %) besteht. Höhere Gaben von Cyclamat verringern also bei vollernährten Tieren den Hb-Gehalt. Bei Mangeltieren war ein derartiger Effekt nicht nachzuweisen. Die Versuchstiere wurden täglich beobachtet, um anomale Veränderungen zu erfassen. Zwischen den Tieren der Kontrollgruppen und den Gruppen mit 0.5 % Cyclamat im Futter war während des Versuchs keinerlei Unterschied zu sehen. Nach 4 - 5 Tagen wurden jedoch bei den vollernährten Gruppen B_1 (1.0 %) bis E_1 (8.0 %) und bei den mangelernährten Gruppen B_2 (1.0 %) bis E_2 (8.0 %) eine stei-

gende Trinkwasseraufnahme bemerkt. Der Kot wurde mit steigenden Cyclamatgaben breiig und bei den Tieren der höchsten Dosierungsstufe wäßrig.

Tab. 5: Ergebnisse der Hb-Gehaltsbestimmung

Gruppenbe- zeichnung	vollernährt (Reihe 1)		mangelernährt (Reihe 2)	
	absol. ³⁾	relativ (%) ¹⁾	absol.	relativ (%)
K	14.47	100.0 $\pm$ 5.3	12.70	100.0 $\pm$ 9.4
E	13.25	91.6 $\pm$ 6.7 ⁺⁺²⁾	13.28	104.6 $\pm$ 10.3

1) Hb-Gehalt bezogen auf die Kontrollgruppe ohne Cyclamat = 100 %
 $\pm$ Standardabweichung

2) Unterschied zur Kontrollgruppe statistisch gesichert:

$$++ \quad P < 0.01$$

3) Absolute Werte mg%

Nach 3 - 4 Wochen des Versuchs trat bei den vollernährten Gruppen D₁ (4.0 %) und E₁ (8.0 %) und bei den mangelernährten Gruppen D₂ (4.0 %) und E₂ (8.0 %) vereinzelt Blut im Kot auf. Das Allgemeinbefinden der Tiere dieser Gruppen war sichtlich verschlechtert. Das Haarkleid war gelblich-bräunlich verfärbt. Die Tiere nahmen eine anomale Körperhaltung ein (hochgezogene Bauchdecke und stark nach oben gekrümmter Rücken). Manchmal wurde für 1 - 2 Tage das Futter verweigert, während Wasser in größeren Mengen aufgenommen wurde. Die Tiere waren besonders in den mangelernährten Gruppen D₂ und E₂ während dieser Zeit sehr reizbar und angriffslustig. Sie brachten sich selbst durch Benagen erhebliche Verletzungen bei. Blutige Laesionen an Schwanzansatz und an der Innenfläche der Oberschenkel wurden häufig festgestellt.

Die Beobachtung der Versuchstiere ergibt, daß die blutigen Laesionen dadurch entstehen, daß die Tiere sich heftig jucken und kratzen (da die Versuchstiere einzeln gehalten wurden, kam eine Verletzung durch ein anderes Tier nicht in Frage). Wir nehmen an, daß das Cyclamat in Konzentrationen von etwa 2 % und mehr im ad libitum gegebenen Futter zu einem heftigen Juckreiz führt.

In unseren Versuchen mit Royal-Wistar Ratten sahen wir deutliche Veränderungen der Versuchstiere von etwa 2 % Cyclamatzulage zum Futter regelmäßig auftreten und die starken Veränderungen, die das in der Abbildung 4 zur Darstellung gebrachte Versuchstier zeigte, trat in etwa der gleichen Weise bei sämtlichen Tieren dieser Versuchsgruppe auf.

Es muß hierzu gesagt werden, daß wir in diesen Versuchen offenbar einen gegenüber Cyclamat hochempfindlichen Rattenstamm erhalten hatten. HOFMANN hat in unserem Institut in späteren Versuchen mit verschiedenen anderen Ratteninzuchtstämmen gearbeitet, jedoch niemals eine derart starke toxische Reaktion beobachtet (22). Es ergab sich jedoch, daß gegenüber diesem Süßstoff nicht nur verschiedene Tierspezies stark unterschiedlich reagieren, sondern daß auch innerhalb der Spezies einzelne Inzuchtstämme ganz unterschiedlich starke Reaktionen auf die Cyclamatzufuhr aufzeigten. Zur Zeit arbeitet HOFMANN beispielsweise mit einem Stamm von Wistar Ratten, die seit mehr als 360 Tagen Cyclamat im Futter erhalten und zwar die am höchsten dosierte Gruppe erhält 10 % Cyclamat im Futter. Diese Tiere haben alle bisher überlebt und zeigen neben der gelblichen Verfärbung des Felles äußerlich nur ein erhebliches Zurückbleiben im Wachstum und der Gewichtszunahme. Diese Cyclamattiere der Gruppe "10 %" sind praktisch nur halb so groß und schwer wie die mit cyclamatfreiem Futter ernährten Kontrollratten. Wir kommen später noch einmal auf diese Befunde zurück.



Abb. 3: Vollernährtes Kontrolltier ohne Cyclamat im Futter (nach 57 Versuchstagen)



Abb. 4: Vollernährtes Tier mit 8 % Cyclamat im Futter (nach 57 Versuchstagen)

Tab. 6: Organgewichte in Prozent des Körpergewichts

Gruppenbezeichnung	Leber		Niere		Caecum voll		Caecum leer	
	1)	2)	1)	2)	1)	2)	1)	2)
K	3.017±0.4 ³⁾	100.0±13.4 ⁴⁾	0.621±0.1	100.0±8.4	0.634±0.2	100.0±27.6	0.199±0.04	100.0±17.6
A	4.259±0.7	100.0±16.8	0.882±0.1	100.0±14.7	0.967±0.1	100.0±9.8	0.264±0.1	100.0±32.9
B	3.251±0.7	107.8±22.4	0.710±0.1	114.3±22.2 [*]	0.701±0.2	110.6±28.4	0.210±0.04	105.5±20.6
C	3.793±0.6	89.1±13.5	0.772±0.1	87.5±9.4 [*]	0.938±0.2	97.0±19.7	0.278±0.1	105.3±21.6
D	2.889±0.3	95.8±10.3 ⁺⁺	0.633±0.1	101.9±9.3	1.047±0.4	165.1±65.1 ⁺⁺	0.355±0.2	178.4±86.9 ⁺⁺
E	3.016±0.3	70.8±9.2 ⁺⁺	0.729±0.1	82.7±12.3 ⁺⁺	1.195±0.9	123.6±92.4	0.268±0.1	101.5±37.5
F	2.541±0.1	84.2±47.4 ⁺⁺	0.604±0.1	97.3±9.8	1.664±0.3	262.5±53.6 ⁺⁺	0.424±0.1	213.1±44.2 ⁺⁺
G	2.844±0.2	66.8±5.5 ⁺⁺	0.775±0.1	87.9±7.4 ⁺⁺	2.084±0.8	215.5±83.9	0.331±0.1	125.4±23.9 ⁺⁺
H	2.593±0.3	85.9±8.8 ⁺⁺	0.629±0.1	101.3±19.5	1.583±0.3	249.7±53.6 ⁺⁺	0.449±0.1	225.6±42.2 ⁺⁺
I	2.874±0.3	67.5±6.0 ⁺⁺	0.747±0.1	84.7±8.4 ⁺⁺	2.919±0.9	301.9±91.2 ⁺⁺	0.625±0.1	236.7±43.2 ⁺⁺
J	2.953±0.5	97.9±15.3	0.752±0.1	121.1±13.9 ⁺⁺	2.854±1.1	450.2±173.3 ⁺⁺	0.732±0.5	367.8±79.4 ⁺⁺
K	3.856±0.4	90.5±99.8	0.958±0.1	108.6±12.4	4.617±1.2	477.5±123.8 ⁺⁺	1.031±0.3	390.5±112.1

1) vollernährte Gruppen (300 % des Bedarfs an B-Vitaminen) + P<0.05

2) mangelernährte Gruppen (65 % des Bedarfs an B-Vitaminen) ++ P<0.01

3) Mittelwert + Standardabweichungen (innerhalb der Gruppe) +++ P<0.001

4) Durchschnittswert + Standardabweichung (Kontrollgruppe)

= 100 %

Abweichung von der jeweiligen Kontrollgruppe statistisch signifikant

Todesfälle traten nur in den Gruppen E mit 8 % Cyclamat auf. Bei den vollernährten Tieren betrug die Überlebensrate 87 %, bei den Mangeltieren 89 %. Die Differenzen zwischen den Gruppen E sind nicht signifikant. Die Versorgung mit B-Vitaminen hat demnach keinen Einfluß auf die letale Wirkung hoher Dosen von Cyclamat.

Nach der Dekapitation wurden alle Ratten makroskopisch untersucht und die Organgewichte festgestellt. Die auf das Körpergewicht bezogenen Organgewichte sind in Tabelle 6 zusammengestellt, die absoluten Werte befinden sich im Tabellenanhang (I., S. 52). Herz, Lunge und Milz sind in der Tabelle 6 nicht aufgeführt, da sich bei diesen Organen keine signifikanten Unterschiede ergaben.

Schon ab 1 % Cyclamat im Futter zeigen sich gesicherte Unterschiede im relativen Gewicht von Leber, Niere und Caecum. Das Gewicht der Leber ist gegenüber den Kontrollen verringert, das des Caecums erhöht. Das Gewicht des leeren Caecums steigt ebenfalls an. Die pathologischen Veränderungen der Organe wurden in der folgenden Tabelle zusammengefaßt (s. Tab. 6, S. 23).

Bei der Sektion sahen wir regelmäßig ein Bild, das auf das Bestehen einer gastroenteritischen Veränderung hindeutete. Unterschiede im Sektionsbild wurden lediglich durch die Menge des verabreichten Cyclamates hervorgerufen.

Der gesamte Magendarmkanal war gebläht und die mesenterialen Gefäße stark blutgefüllt. Magen und Darm waren mit einer wäßrigen Flüssigkeit gefüllt in der man mikroskopisch sehr deutlich Cyclamatkristalle nachweisen konnte. Die Schleimhaut von Magen und Darm wies die typischen Zeichen einer entzündlichen Veränderung auf, mit stark erweiterten Gefäßen und zum Teil mit Blut vermischter Schleimschicht auf der entzündlich verdickten Mukosa.

Ein offenbar für die Cyclamateinwirkung ganz typischer Effekt wurde von uns am Caecum entdeckt, das ganz regelmäßig vergrößert war (vgl. Gewichtstab. 6, S.23, sowie spätere Abb.). Diese Caecumvergrößerung war um so mächtiger, je höher die verabfolgte Cyclamatkonzentration im Futter gelegen hatte. Sie erwies sich als reversibel. Wenn man Tieren, die sich im Cyclamatversuch befunden hätten, den Süßstoff aus dem Futter wegließ, so war bei diesen Tieren bereits 9 Tage später wieder die Größe des Caecums normal. Wir gehen später auf diesen charakteristischen und absolut regelmäßig zu findenden Befund ein.

An der Leber der Cyclamattiere fanden wir eine ganz geringgradige Vergrößerung, wenn Cyclamat wenigstens 5 Wochen lang in mehr als 2 %iger Konzentration dem Futter zugesetzt wurde. Diese Lebern zeigten dann auch ganz regelmäßig bereits makroskopisch die Anzeichen einer Verfettung.

Die Nieren und abführende Harnwege zeigten in den Nierenbecken (nach 8 % Cyclamat im Futter), sowie in der Blase Harnkies, der sich im mikroskopischen Bild und nach der Schmelzpunktsbestimmung als reines Cyclamat erwies. Dieser Befund deutet daraufhin, daß ein Teil des Süßstoffes unverändert den Organismus passiert. Wir haben weiterhin in einigen Fällen eine eindeutige Vergrößerung der Milz beobachtet und bei den spontan im Versuch zum Exitus gekommenen Tieren Anschoppung in beiden Lungen und die Zeichen einer doppelseitigen Pneumonie. Am Herz und Kreislaufsystem haben wir keinen pathologischen Befund erhoben.

Tab. 7: Makroskopisch erkennbare pathologische Organveränderungen

Gruppen	Leber- verfettung	Milz- schwellung	Nieren- entz.	Blasen- entz.	Blasengries bzw. Steine	Darm- entz.	Caecum- entz.	Gas- ansammlungen (Caecum + Darm)	Schwanz + Anal- gegend- entz.
K ₁	4	-	-	-	-	1	-	-	2
A ₁	3	1	-	-	-	1	-	1	-
B ₁	2	-	-	1	1	2	-	4	-
C ₁	1	-	2	1	2	3	-	5	1
D ₁	2	2	4	1	5	5	2	13	6
E ₁	1	1	5	2	6	5	3	11	7
K ₂	1	1	-	-	-	-	-	-	-
A ₂	-	-	1	1	-	2	-	2	-
B ₂	1	-	1	-	2	4	-	4	-
C ₂	1	2	2	-	2	4	-	9	1
D ₂	-	1	5	2	5	5	1	17	5
E ₂	2	3	6	2	7	7	1	13	6

1) vollernährte Gruppen

2) mangelernährte Gruppen

Die pathologischen Veränderungen treten also bei hohen Cyclamatgaben besonders an Magen, Darm, Caecum, Blasen und Nieren auf.

So ist besonders bei den Gruppen D₁ - E₁ eine starke Cystitis, sowie Blasensteine und Blasengries zu erwähnen, auch fällt bei diesen Gruppen die häufige Enteritis, sowie eine Vergrößerung und Auftreibung des Caecums auf. Die Schwanz- und Analgegend ist

bei diesen Tieren durch Autostimulation besonders in Mitleiden-
schaft gezogen.

Fast das gleiche Bild zeigen die Gruppen C₂, D₂, E₂, nur ist
hier die Caecumvergrößerung in stärkerem Maße ausgeprägt als
bei den Tieren der 1. Versuchsreihe. Auch waren mehr Tiere mit
einer Cystitis anzutreffen. Zahlenmäßig genau aufgeführt sind
diese Werte in Tabelle 7.

Versuch II

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob durch Cyclamat-
aufnahme die Verwertung der Nahrung beeinträchtigt wird.

Tab. 8: Anordnung des Versuchs II

Gruppenbe- zeichnung	Cyclamat im Futter (%)	Futtermenge (%) ⁺⁾ (incl. Teststoff)
K	0	92.0
A	1.0	93.0
B	2.0	94.0
C	4.0	96.0
D	8.0	100.0

+) bezogen auf Futtermenge von Gruppe D

5 Versuchsgruppen mit jeweils 12 Tieren erhielten 10 Wochen lang
unterschiedliche Cyclamatmengen (s. Tab. 8) bei gleich hoher Zu-
fuhr von Grundfutter. Die Gesamtfuttermenge (Cyclamat + Grund-
futter) steigt dadurch in der Reihenfolge der Gruppen K - D an.
Durch diese in Anlehnung an die "paired feeding" Technik ent-
wickelte Fütterungsmethode wird sichergestellt, daß die Tiere

aller Gruppen gleiche Nährstoffmengen erhalten. Auf diesem Wege läßt sich eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch unterschiedlich hohe Futteraufnahme vermeiden. Die Gewichtsentwicklung der Tiere geht mit der Ausnutzung der Nahrung parallel. Wie im vorhergehenden Versuch wurden die Tiere vor Versuchsbeginn an die Zufuhr von Cyclamat gewöhnt. Der Futterverbrauch wurde täglich festgestellt.

Die Beeinflussung der Futterverwertung über eine Versuchsdauer von 7 Wochen durch Verabreichung von Cyclamat ist aus Tabelle 9 zu ersehen.

Tab. 9: Futterwirkungsverhältnis in Abhängigkeit von der Cyclamataufnahme (50. Versuchstag)

Cyclamat im Futter (%)		0	1.0	2.0	4.0	8.0
Futter- wirkungs- verhältnis	rel.(%) ¹⁾	100.0	99.3	91.7	84.5	68.1
		±14.2	±15.8	± 7.7	± 8.4 ⁺⁺²⁾	± 8.6 ⁺⁺⁺
	abs.	0.201	0.198	0.183	0.168	0.136

1) Futterwirkungsverhältnis bezogen auf die Kontrollgruppe ohne Cyclamat = 100 % ± Standardabweichung

2) Unterschied zur Kontrollgruppe statistisch gesichert:

++ $P < 0.01$

+++ $P < 0.001$

Bei gleicher Futteraufnahme aller Gruppen hat sich die Gewichtszunahme und damit die Ausnutzung der Nahrung ab 4 % Cyclamat im Futter wesentlich verschlechtert. Es ist zu ersehen, daß Cyclamatgaben die Futterverwertung verschlechtern. Die Depression ist jedoch erst ab 4 % Cyclamat signifikant.

Das Futterwirkungsverhältnis wurde noch einmal nach 10 wöchiger Versuchsdauer bestimmt. Dabei wurde praktisch das gleiche Ergebnis erzielt, nur mit dem Unterschied, daß schon ab 2 % Cyclamat ein gesicherter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe vorlag (s. Tab. 10).

Tab. 10: Futterwirkungsverhältnis am Ende des Versuchs
(70. Tag)

Cyclamat im Futter (%)		0	1.0	2.0	4.0	8.0
Futter- wirkungs- verhältnis	rel. (%) ¹⁾	100.0	95.7	89.9	85.1	70.1
		± 13.8	± 13.0	$\pm 8.2^{+2)}$	$\pm 8.4^{++}$	$\pm 6.8^{+++}$
	abs.	0.191	0.183	0.172	0.163	0.134

1) Futterwirkungsverhältnis bezogen auf die Kontrollgruppe
ohne Cyclamat = 100 % $\pm$ Standardabweichung

2) Unterschied zur Kontrollgruppe statistisch gesichert:

- + $P < 0.05$
- ++ $P < 0.01$
- +++ $P < 0.001$

Die Trinkwasseraufnahme der Tiere steigt mit der Cyclamatdosis stark an. Diese Veränderungen sind in der Tabelle 11 und Abbildung 5 erfaßt.

Tab. 11: Wasserbedarf in Abhängigkeit von Cyclamatgaben

Cyclamat im Futter (%)		0	1	4	8
Wasseraufnahme	rel. ¹⁾	100.0	110.7	163.6	198.3
		± 39.3	± 45.6	$\pm 60.5^{+2)}$	$\pm 47.4^{+++}$
	abs.(g)	18.76	20.76	30.69	37.20

1) Trinkwasseraufnahme bezogen auf die Kontrollgruppe ohne

Cyclamat = 100 % $\pm$ Standardabweichung

2) Unterschied zur Kontrollgruppe statistisch gesichert

+ $P < 0.05$

+++ $P < 0.001$

Im einzelnen konnte festgestellt werden, daß sich der Wasserverbrauch bei 1.0 % Cyclamat im Futter leicht, bei 4.0 % stark und bei 8.0 % fast auf das Doppelte erhöhte.

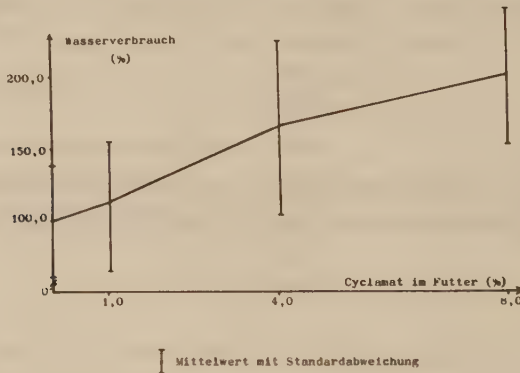


Abb. 5: Trinkwasseraufnahme in Abhängigkeit von der Cyclamatgabe bei gleich hohem Futterverzehr

Im zweiten Versuch wurde auch noch einmal ausführlicher der Frage nachgegangen, in welchem Umfang der Hb-Gehalt durch Cyclamatgaben beeinflusst wird. Der Hb-Gehalt wurde zu Anfang, in der Mitte und zu Ende des Versuchs bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 zusammengefaßt.

Tab. 12: Hb-Gehalt zu Anfang, in der Mitte und zu Ende des Versuchs

Ver- suchs- tag	Cyclamat im Futter (%)					
	0	1.0	2.0	4.0	8.0	
1	rel. ¹⁾	100.0	106.3	104.8	107.0	108.1
	± 20.9 ²⁾	± 11.5	± 10.5	± 7.1	± 7.2	
	mg% ³⁾	11.54	12.27	12.09	12.35	12.47
37	rel.	100.0	107.5	109.2	107.4	115.2
	± 9.8	± 10.5	± 6.6	± 5.4	± 6.9 ⁺⁺⁺	
	mg%	12.33	13.26	13.47	13.24	14.21
66	rel.	100.0	101.3	102.2	102.4 ⁺	103.1
	± 2.9	± 3.5	± 1.9	± 1.3	± 3.6 ⁺	
	mg%	13.75	13.93	14.05	14.08	14.17

1) Hb-Gehalt in Prozent der Kontrollgruppe (ohne Cyclamat)
± Standardabweichung

2) Unterschied zur Kontrollgruppe statistisch gesichert
+ $P < 0.05$
++ $P < 0.01$
+++ $P < 0.001$

3) Hb-Gehalt in mg%

Wie Tabelle 12 erkennen läßt, ist am 37. Versuchstag bei den Gruppen ab 2 % Cyclamat eine deutliche Erhöhung der Hb-Werte festzustellen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem Befund des I. Versuchs, wo eine 8.0 %ige Cyclamatzufuhr bei den

vollernährten Tieren die Hb-Werte signifikant erniedrigte. Die Ursache für diese unterschiedliche Feststellung bleibt für uns ungeklärt. Die spektrophotometrische Untersuchung des Blutes ergab, daß sich kein Methämoglobin nachweisen ließ.

Ein gestörtes Allgemeinbefinden der Tiere durch tägliche Cyclamataufnahme wurde an Hand von äußerlich sichtbaren Zeichen wie im Versuchsteil I festgestellt. Die Tiere der Gruppen K - B (2.0 %) zeigten keine Störungen im Allgemeinbefinden. In der Gruppe D (4 %) verweigerten 6 Tiere zeitweise die Aufnahme von Futter und Wasser. Alle Tiere dieser Gruppe waren sehr reizbar und hatten Durchfall. Diese Symptome verstärkte sich bei 8 % Cyclamat im Futter. So hatten alle Tiere wäßrigen Durchfall, der manchmal blutig war, alle krümmten den Rücken stark, waren sehr reizbar, nervös und angriffslustig. 5 Tiere brachten sich selbst Verletzungen an den Hintergliedmaßen bei (s. Abb. 6 u. 7).



Abb. 6: Kontrolltier (ohne Cyclamat nach 57 Versuchstagen)



Abb. 7: Tier mit 8.0 % Cyclamat im Futter (nach 57 Versuchstagen)

Das Haarkleid war bei den Gruppen C (4.0 %) und D (8.0 %) gelblich-bräunlich verfärbt und struppig. Oft waren blutige Laesionen am Schwanzansatz und an der Innenfläche der Oberschenkel bemerkbar.

Der Kot war bei den Gruppen, die bis zu 2.0 % Cyclamat erhielten, nicht verändert, bei den Gruppen mit 4.0 % und 8.0 % war er teils schlecht geformt und feucht, teils wäßrig.

Hinsichtlich der Überlebensrate war zwischen den Gruppen kein Unterschied vorhanden.

Auf Grund der Ergebnisse des ersten Versuchs wurden Herz, Lunge und Darmkanal nur noch makroskopisch untersucht. Die weitere Organe wie Milz, Leber, Niere, Caecum (gefüllt und leer) wurden sowohl auf pathologische Veränderungen untersucht als auch gewogen. Die Organgewichte wurden in Prozent vom Körpergewicht berechnet (Tab. 13, S.34) (absolute Werte, s. Tabellenanhang II, S.53).

Tab. 13: Organgewichte in Prozent des Körpergewichts

Gruppenbezeichnung	Leber	Caecum voll	Caecum leer	Niere	Milz
K	3.586 ₁ +0.3	100.0 +7.4	1.670 +0.3	100.0 +6.7	0.258 +0.05
A	3.203 +0.2	89.3 +6.3 ⁺⁺⁺	1.990 +0.4	116.8 +27.5	0.241 +0.1
B	3.067 +0.1	85.5 +4.0 ⁺⁺⁺	2.643 +0.8	133.3 ⁺⁺ +30.0 ⁺	0.239 +0.1
C	2.953 +0.2	82.3 +5.7 ⁺⁺⁺	5.107 +1.5	230.0 ⁺⁺ +35.2 ⁺	0.228 +0.1
D	3.021 +0.2	84.2 +4.7 ⁺⁺⁺	5.742 +1.1	326.4 ⁺⁺⁺ +49.1 ⁺	0.246 +0.1

- 1) Mittelwert $\pm$ Standardabweichung innerhalb der Gruppe
- 2) Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (Kontrollgruppe ohne Cyclamat = 100 %)
- 3) Unterschied zur Kontrollgruppe statistisch gesichert:

$+$ $P < 0.05$
 $++$ $P < 0.01$
 $+++$ $P < 0.001$

Schon ab 1 % Cyclamat im Futter zeigen sich gesicherte Unterschiede im relativen Gewicht von Leber und Caecum gegenüber den Kontrollen. Das Gewicht der Leber ist fast unverändert und das Caecum ist wesentlich schwerer geworden. Auch das Gewicht des leeren Caecums hat zugenommen.

Wie die Ergebnisse nach der Sektion der Versuchstiere des ersten Versuchsteils zeigten, treten beginnend bei Gaben von 2 % Cyclamat im Futter Caecumvergrößerungen auf. Diese werden mit steigenden Cyclamatdosierungen verstärkt. In einem Nebenversuch wurde geklärt, ab welcher Zeit nach der Verabreichung von 8.0 % Cyclamat in halbsynthetischer Kost und in "Altromin-R" die Caecumgewichtsveränderungen auftraten, und ob und wann sie nach dem Absetzen des Cyclamats wieder zurückbildeten. Die Ergebnisse zeigen die folgenden Tabellen und Abbildungen (Tab. 14, S. 36, Abb. 8, S. 37).

Tab. 14: Entwicklung des Caecumgewichtes bei zeitweiliger Cyclamataufnahme

Mit vollwertiger halbsynth. Kost				Mit "Altromin-R"	
Gruppe	Versuchszeit	Caecum voll	Caecum leer	Caecum voll	Caecum leer
I ¹⁾	6 Std.	1.846 ³⁾	0.639	1.646	0.538
II ²⁾		1.647	0.656	1.735	0.646
I	1 Tag	2.102	0.740	1.972	0.645
II		3.971	1.265	3.943	1.113
I	3 Tage	2.570	0.593	2.338	0.571
II		5.366	1.564	4.832	1.157
I	6 Tage	2.578	0.679	2.412	0.735
II		5.198	1.555	5.039	1.651
Der Teststoff wurde nach dem 6. Tag abgesetzt					
I	14 Tage	2.389	0.629	2.324	0.837
II		2.851	0.813	2.831	0.737
I	16 Tage	2.506	0.544	2.109	0.511
II		2.765	0.747	2.887	0.803

1) Kontrollgruppe ohne Cyclamat

2) 8.0 %ige Cyclamatgabe im Grundfutter

3) Organgewichte in Prozent des Körpergewichts (Mittelwert von jeweils 2 Tieren)

Tabelle 14 und Abbildung 8 zeigen, daß bei halbsynthetischer Kost durch 8 %ige Cyclamatgabe die Caecumveränderungen nach 6 Stunden noch nicht, nach 24 Stunden aber deutlich auftreten und etwa am dritten Tag ihre größte Ausdehnung bereits erreicht haben. Die Rückbildung nach Absetzen des Cyclamates war nach 10 Tagen praktisch abgeschlossen. Die leeren Blinddärme zeigten eine ähnliche Gewichtsentwicklung wie die vollen. Es hatte keinen hinsichtlichlichen Einfluß auf die Entwicklung der Blinddarmgewichte,

ob Cyclamat gemeinsam mit der halbsynthetischen Kost oder mit Altromin verabreicht wurde.

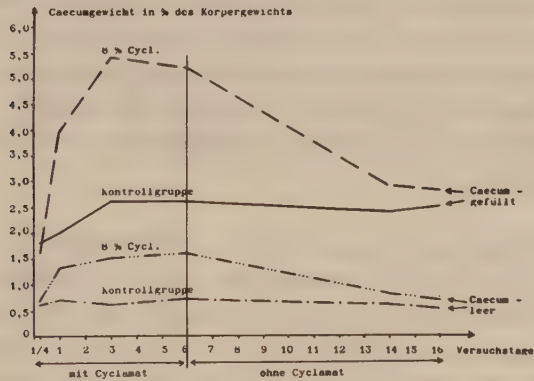


Abb. 8: Caecumveränderungen nach verschiedenen Zeitabständen bei Verabreichung von Cyclamaten in halbsynthetischem Grundfutter

D. AKUTE GIFTWIRKUNG DURCH HOHER CYCLAMATDOSEN

Wir haben in weiteren Versuchen die akute Wirkung hoher Cyclamatgaben und insbesondere die mittlere tödliche Dosis (LD_{50}) bestimmt. Anlaß zu dieser für die Diskussion der Versuchsergebnisse notwendig erscheinenden Arbeit war die Tatsache, daß wir in der Literatur keine einheitlichen Angaben über die letale Dosierung dieses Süßstoffes finden. Dies liegt offenbar an der Tatsache, daß, wie wir bereits weiter oben bemerkt haben, die Empfindlichkeit innerhalb verschiedener Ratteninzuchtstämme schwanken kann.

Wir bestimmten die LD_{50} an unserem Tiermaterial, indem wir das Cyclamat in wäßriger Aufschwemmung mit der Schlundsonde verabreichten. Die relativ geringe Toxizität der Verbindung zwingt dazu, ähnlich wie bei der Ermittlung der Toxizität weitgehend ungiftiger Antipyretika und Antibiotika, die Zufuhr bei allen hohen Dosierungen gestaffelt, d.h. in 2 Gaben innerhalb von 2 Stunden zu geben. Wird die Gesamtmenge der Aufschwemmung in einer einzigen Sondierung gegeben, so wird der Magen der Versuchstiere übermäßig gedehnt. Hierbei haben wir einmal eine Magenruptur gesehen und regelmäßig die Folgen einer excessiven Magenüberdehnung, die nach Möglichkeit ausgeschaltet werden muß.

Der von uns ermittelte Wert der LD_{50} liegt auffällig niedrig. Andere Autoren haben bis 10.0 - 12.0 g/kg per os. als LD_{50} beschrieben. Dies deutet darauf hin, daß unser Tiermaterial offenbar außerordentlich empfindlich gegenüber dem Süßstoff war. Darauf deuten weiterhin die sehr starken Veränderung der Versuchstiere hin, wie wir sie in Abbildungen 4 und 7 (S. 22 u. 33) gezeigt haben und wie wir sie beschrieben haben.

Tab. 15: LD₅₀-Berechnung

LD₅₀ wurde nach folgender Formel nach BEHRENS-KÄRBER (4) berechnet:

$$AM = D_m - \sum \frac{(z \cdot d)}{m}$$

Gruppen	Zahl der Tiere	Gruppen-gew./g	Dosis in g/kg Ratte	Mortalität abs.	rel. %	z =	d =	z.d =
K	6	442.83	-	-	-	A:B 4	2.26	9.04
A	6	442.83	2.26	-	-	B:C 1.5	2.26	3.39
B	6	442.83	4.52	4	66.7	C:D 0.5	2.26	1.13
C	6	442.85	6.78	5	83.3	D:E 0	2.26	0
D	6	443.00	9.04	6	100.0			
E	6	442.83	11.30	6	100.0			13.56

AM = arithmetisches Mittel der LD₅₀

DM = Dosis bei welcher sämtliche Tiere verendeten

z = halbe Summe der bei 2 aufeinanderfolgenden Dosen verendeten Tieren

d = Differenz der Zahlenwerte der Dosis in g/kg von 2 aufeinanderfolgenden Gruppen

$\sum$ = Summe von z . d von allen Gruppen

m = Anzahl der Tiere je Gruppe

In die angegebene Formel eingesetzt ergibt sich folgender Wert für die LD₅₀

$$AM = 9.04 - 2.26$$

$$AM = 6.78 \text{ g/kg}$$

$$LD_{50} = 6.78 \text{ g/kg Ratte}$$

Vergiftungsbild

Nach der perorale Zufuhr akut toxische Dosierungen ist das Vergiftungsbild dadurch gekennzeichnet, daß die Versuchstiere zunächst zusammengekauert und fast bewegungslos in ihren Käfigen saßen. Sie vermeiden in diesem Stadium jede Bewegung. Nach etwa 30 Minuten beginnen die Versuchstiere unruhig zu werden, es kommt zu Zittern der Extremitäten und tonisch-klonischen Krampfanfällen. Das Herz schlägt mit sehr hoher Frequenz, die Atmung wird krampfhaft und die Schleimhäute sowie die Haut der Tiere selbst nehmen eine geringe livide Verfärbung an.

Der Tod der Versuchstiere trat meist nach wenigen (2-4) heftigen tonisch-klonischen Krampfanfällen unter Atmungslähmung ein. Das Herz der Tiere schlägt nach dem Atemstillstand etwa 1 Minute weiter.

Das Sektionsbild bot sowohl bei den am Versuchsende getöteten wie den während des Versuchs spontan verstorbenen Tieren ein ähnliches Bild: maximal geblähter Magen-Darmkanal mit den Anzeichen einer entzündlichen Veränderung der Schleimhaut (Gastroenteritis) und die bereits beschriebene mächtige, reversible Vergrößerung des Caecums. Diese Veränderung ist nicht nur bemerkenswert, weil sie in unseren Cyclamatversuchen ganz regelmäßig auftrat, sondern weil sie dem Pathologen bisher nur bekannt war bei steril aufgezogenen, durch Schnittentbindung zur Welt gebrachten Tieren sowie bei solchen, die längere Zeit unter der Einwirkung eines Antibiotikums standen. Ob demnach Cyclamat eine charakteristische Veränderung der bakteriellen Darmflora hervorruft, müssen weitere spezielle Experimente klären.

Die Befunde an Herz und Kreislaufsystem sowie an den Lungen, waren abgesehen von einer gelegentlich auftretenden Pneumonie bei spontan im Versuch verstorbenen Tieren uncharakteristisch.

Die Leber war bei Tieren, die lang im Versuch mit hohen Cyclamatkonzentrationen im Futter waren (4 %), meist geringgradig vergrößert und bereits makroskopisch als Fettleber zu erkennen. Im Gegensatz dazu steht der Befund, daß wir im Bereich niederer Konzentrationen eher eine Verringerung des Lebergewichtes beobachteten, was wiederum in guter Übereinstimmung mit Befunden der Pathologen an steril aufgezogenen Ratten oder Ratten unter Antibiotikawirkung steht.

Die Nieren erhielten, wie wir bereits berichteten, im Nierenkelch und in den abführenden Harnwegen Cyclamate in Form von Harngries, was darauf hindeutet, daß ein großer Teil dieses Süßstoffes unverändert über die Nieren eliminiert wird.

Die Leber zeigte histologisch eine mehr oder weniger starke zentrale Verfettung, aber keine Vermehrung der PAS-positiven Substanzen. An der Niere fanden wir histologisch keinen charakteristischen, pathologischen Befund.

Bemerkenswert ist noch die Tatsache, daß die Tiere ausnahmslos kurz nach Beginn des Cyclamatversuchs sich insofern veränderten, als die vorher handzahmen Tiere aggressiv, bissig und stark unruhig wurden. Diese Unrast und Aggressivität tritt ganz regelmäßig auf.

Bei Altrominfütterung zeigten die Tiere bei gleich hoher Cyclamatverabreichung keine so weitgehenden Störungen im Allgemeinbefinden wie die Tiere in Versuchsreihe 2.

E. DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

Unsere Versuche mit dem Süßstoff Cyclamat haben ergeben, daß diese Verbindung bei peroraler Zufuhr ganz regelmäßig zum Auftreten von wäßrigen Diarrhoeen führt. Die Konzentration nach der diese Erscheinung auftritt liegt zwischen 1 und 2 % Cyclamat im Futter. Gleichlaufend mit dem Auftreten der Durchfälle kommt es zu einer Verlangsamung des Gewichtszuwachses, ja, evtl. sogar zum Gewichtsstillstand. Bei jungen Tieren tritt häufig für die Dauer von 2 - 3 Wochen ein völliger Gewichtsstillstand und Aufhören des Wachstums auf.

Wir nehmen an, daß diese laxierende Wirkung, die nach der Zufuhr des Süßstoffes zu beobachten ist, darauf zurückzuführen ist, daß das Cyclamat im Magendarmkanal genau wie die salinischen Abführmittel Lösungswasser an sich reißt, dessen Rückresorption dann auch im Enddarm ausbleibt. Dadurch kommt es zu einem mächtigen Füllungsreiz und der daraus resultierenden Laxation.

Wahrscheinlich infolge der dauernden wäßrigen Entleerungen wird ein Juckreiz auf die Haut in der Umgebung des Anus und im Bereich der hinteren Extremitäten gesetzt, der dazu führt, daß die Versuchstiere sich selbst erhebliche Verletzungen und Laesionen der Haut durch heftiges Kratzen beibrachten. Hierdurch wird das Fell der Tiere an manchen Körperstellen völlig vernichtet und durch eine gleichzeitig auftretende gelbliche Verfärbung des Felles, das zudem noch struppig wird, gewinnen die Versuchstiere ein schwerkrankes Aussehen, wie wir es in unseren Abbildungen demonstrieren konnten.

Bereits diese Befunde zeigen, daß der Süßstoff Cyclamat keinesfalls als völlig unbedenklich bezeichnet werden darf. Wenn wir (wie später in unserem Institut auch in Versuchen an freiwilligen Versuchspersonen gezeigt werden konnte) das Auftreten der wäßrigen

und zum Teil spastischen Diarrhoeen als das wichtigste, durch den Süßstoff verursachte Symptom bezeichnen wollen, so muß weiterhin darauf verwiesen werden, daß der besonders bei jungen Tieren auftretende Wachstumsstillstand als ernste Begleitscheinung der chronischen Cyclamatanwendung zu bezeichnen ist, der insbesondere bei Kindern zu schweren Störungen führen könnte. Die Gefahr liegt hier, in der eingangs skizzierten Möglichkeit, alkoholfreie Fruchtsaftgetränke oder Eiskrem oder Backwerk mit Cyclamat zu süßen. Hierdurch ist nicht nur rein theoretisch das Kind besonders bedroht, das an einem heißen Sommertag ohne weiteres 1 - 2 Liter cyclamatgesüßten Saft und entsprechende Menge anderer süßstoffhaltiger Genußmittel aufzunehmen bereit ist und hierdurch in Gefahr gerät eine Gesundheits- und Entwicklungsstörung zu empfangen.

Unsere Versuche mit B-Vitaminen haben gezeigt, daß eine sichere Beeinflussung des Körpergewichts nicht vorhanden ist. Die wenigen statistisch signifikanten Unterschiede waren außerordentlich stark gestreut, so daß Versuche mit B-Mangel erst nach Vergrößerung der Versuchstierkollektive repräsentativ würden. Die durch Cyclamat hervorgerufenen Gewichtsdepression war mit 300 %iger Versorgung der Versuchstiere mit B-Vitaminen genau so stark ausgeprägt wie bei den Tiergruppen, die nur 65 % ihres Vitamin B-Bedarfs erhielten. Ein B-Mangel führt also weder zu einer Steigerung der Toxizität des Cyclamates, wie dieser Süßstoff andererseits auch nicht den Bedarf an diesen Vitaminen beeinflusst.

So ist zu sagen, daß der Befund, daß gleich hohe Cyclamatgaben die Futteraufnahme von Vitamin-Mangelratten weniger stark verringern als von vollernährten Tieren, nur mit Vorbehalt zu erklären ist. Eine Vitaminsparwirkung wäre paradox, bei dem Bestehen einer extremen Diarrhoe. Eine Beeinflussung, durch Cyclamat hervorgerufen, im Sinne einer Vitamineinsparung ist ebenfalls unwahrscheinlich, da sie zumindest beispielsweise nicht an Hand

einer Gewichtszunahme nachweisbar wird. Eher dürfte anzunehmen sein, daß sich ganz allgemein die Cyclamatwirkung mit der des Vitaminmangels in Richtung auf eine Verschlechterung der Verdauungs- und Resorptionsleistung verstärken. Der Befund, daß der Süßstoff das Futterwirkungsverhältnis stärker verschlechtert als am vollernährten Tier, spricht dafür.

Der ungünstige Einfluß von Cyclamat auf die Ausnutzung der Nahrung ist sowohl bei halbsynthetischer Kost als auch bei Verabreichung von Altromin-Rattenalleinfutter nach einer modifizierten "paired-feeding" Technik zu erkennen. Das Futterwirkungsverhältnis war schon ab 2.0 % Cyclamat statistisch gesichert verschlechtert.

Es ist bereits nachgewiesen worden, daß bei Verabreichung von 5 % Na-Cyclamat an Ratten ein erhöhter Nahrungsbedarf vorlag (18). Ebenso war bei 5 % Na-Cyclamatgabe im Futter über 2 Jahre eine verschlechterte Futterverwertung nachzuweisen (zit. nach 32). Auch bei kürzerer Versuchszeit mit 5 und 10 % Ca-Cyclamat trat eine schlechtere Futterverwertung auf (32). Da die Futterverwertung bei Altrominverfütterung in unseren Versuchen schon bei einer geringeren Cyclamatgabe verschlechtert war als bei der halbsynthetischer Kost, kann man annehmen, daß die Cyclamatwirkung auch von der Zusammensetzung des Grundfutters abhängig ist.

Es wird berichtet, daß bei 5 und 10 % Ca-Cyclamatverabreichung im Futter die Trinkwasseraufnahme der Tiere 25 - 40 % höher als bei jeweiliger Kontrollgruppe lag (32). Auch beim ersten Teil unserer Versuche war der hohe Wasserverbrauch aufgefallen. In der zweiten Versuchsserie wurde dieser Frage experimentell nachgegangen. Es ergab sich, daß die Trinkwasseraufnahme schon bei Cyclamatgaben von 1 % ansteigt. Bei 8 % Cyclamat im Futter ist der Wasserverbrauch etwa doppelt so hoch wie bei der Kon-

trollgruppe. Wahrscheinlich ist dies vorwiegend auf die laxierende Wirkung des Cyclamats mit hohen Wasserverlusten in den Faeces zurückzuführen. Der extrem gefüllte und geblähte Darm, der beim Aufschneiden große Mengen cyclamathaltiger wäßriger Darminhalten entleert, zeigt uns, daß die Tiere nach Verabreichung größerer Mengen von dem Süßstoff im Futter außerordentlich viel Trinkwasser aufnehmen (s. Tab. 11, S. 30), und daß eine Resorption des aufgenommenen Wassers weitgehend verhindert wird.

Das Allgemeinbefinden der Tiere mit Mangel- und Vollernährung war bis zu 2 %iger Cyclamatgabe nicht erkennbar gestört. Bei höherer Dosierung waren insbesondere die Mangeltiere unruhig, nervös, bissig und sehr angriffslustig. Dies trat nach mehr als 2 % Cyclamat im Futter bei ad libitum Fütterung auf, und wir deuten sie mit der in der Zwischenzeit eindeutig von ICHIBAGASE und MARQUARDT und seinen Mitarbeitern nachgewiesenen intermediären Bildung von Cyclohexylamin, das eine typische zentral erregende und sympathikomimetische Wirkung, ganz ähnlich wie die der chemisch verwandten Weckamine besitzt (26, 30). Auch bei den Ratten gibt es, genau wie beim Menschen (wie spätere Versuche in unserem Institut zeigten) starke und schwache Cyclohexylaminbildner, so daß das Bild der Unrast und Erregung bei den Versuchstieren unterschiedliche Grade aufweist.

Bei Hb-Gehaltsbestimmungen konnten zwischen den Gruppen keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden. Dieser Befund entspricht den Literaturangaben, wonach der Hb-Gehalt bei 5 - 10% Ca-Cyclamatgabe keine größeren Veränderungen aufwies (25, 32). Auch bei verschiedenen Arten von Cyclamatgaben konnte ein Einfluß auf den Hb-Gehalt nicht festgestellt werden (1, 5, 25, 33). Man kann daher annehmen, daß die Cyclamate keinen wesentlichen Einfluß auf die Blutbildung haben (3, 12, 13, 21, 36, 37). Weitere Blutuntersuchungen auf Methämoglobin, sowie Ausstriche zeigten keine unphysiologischen Abweichungen.

Bei der Urinuntersuchung wurden bei allen Tieren Cyclamatkristalle gefunden. Es konnten bei allen Tieren keine pathologischen Abweichungen im Eiweiß und Glukogengehalt festgestellt werden, lediglich der pH-Wert zeigte geringe Schwankungen im Bereich zwischen 6 und 8.

Hinsichtlich der Überlebensrate zeigte sich kein Unterschied zwischen Tieren im Vitaminmangel und bei ausreichender Ernährung. Die LD₅₀ ist bei 8 % Cyclamatverabreichung noch nicht erreicht.

Ziel dieser Untersuchung war es, das gesundheitliche Risiko, das bei Aufnahme verschieden hoher Cyclamatmengen für den Menschen besteht, durch Rückschlüsse aus Tierversuchen zu beurteilen. Der sogenannte "no toxic effect level" (Teststoffmenge, die ohne toxische Wirkung vom Versuchstier aufgenommen werden kann) gilt als Ausgangspunkt unserer Betrachtungen. Bei der Übertragung von Ergebnissen aus derartigen Tierversuchen auf den Menschen wird üblicherweise ein Sicherheitsfaktor von 100 angenommen. Hiermit sollen neben dem Übertragungsrisiko schlechthin insbesondere der gegenüber dem Menschen höhere Entgiftungskapazität (Stoffwechselintensität) des Versuchstieres und einer evtl. vorhandener grösserer Empfindlichkeit bestimmter Menschengruppen (Kranke, Kinder usw.) Rechnung getragen werden.

Die duldbare tägliche Aufnahme (acceptable daily intake = ADI) pro Person läßt sich wie folgt berechnen:...

$$\frac{\text{"no toxic effect level"}}{\text{"safety factor"}} = \text{ADI (16)}$$

Das durchschnittliche Gewicht und die durchschnittliche Futteraufnahme bei vollernährten weißen Ratten wurde für die Versuchszeit von 70 Tagen bestimmt. So war es möglich, die Aufnahme an Cyclamaten je kg Ratte zu errechnen. Unter Einbeziehung eines

Sicherheitsfaktors von 100 errechnen sich für einen 75 kg schweren Menschen, die in Tabelle 16 niedergelegten Werte.

Die von uns gefundene LD_{50} von 6.78 g/kg zeigt zunächst, daß die Cyclamate zu den wenig akut giftigen Stoffen zu rechnen sind. Unsere weiteren Versuche deuten jedoch darauf hin, daß Cyclamate keinesfalls als harmlose Substanzen aufzufassen sind.

Wachstumsstillstand, verschlechterte Futterverwertung, das Auftreten evtl. blutiger Diarrhoeen und schließlich der offenbar auftretende Juckreiz deuten zunächst bereits an, daß bei chronischer Zufuhr von Cyclamaten eine gewisse Zurückhaltung geboten erscheint.

Das wichtigste Symptom besteht aber zweifelsohne in dem Auftreten der zentral-nervösen Erregung. Diese ist zwischen durch die zunächst von ICHIBAGASE durchgeführten Nachweis der Bildung von Cyclohexylamin als Metaboliten erklärbar und MARQUARDT und seine Mitarbeiter haben gezeigt, daß diese Verbindung schwere Nebenwirkungen, zentrale Erregungen und sympathikomimetische Wirkungen hervorruft. Auf diese ZNS-Wirkung ist auch das Auftreten der tonisch-klonischen Krämpfe zu buchen, die wir beobachtet haben. QUADBECK hat in einer bisher noch unveröffentlichten Arbeit im EEG von Tieren, die Cyclamat erhielten, gesehen, daß es zu einer zentral-nervös erregenden Wirkung kommt (persönliche Mitteilung an Prof. HOFMANN). Diese führt dann auch dazu, daß, wie wir bereits eingangs beschrieben haben, die vorher handzahmen Tiere nach der Cyclamatzufuhr reizbar und bissig, ja direkt aggressiv werden und daß bei den Tieren eine deutliche Unrast und Unruhe auftritt.

Wir wissen inzwischen, daß beispielsweise beim Menschen Cyclohexylamin in sehr unterschiedlichen Mengen gebildet wird. Die Angaben schwanken zwischen 0.3 - 60 % des zugeführten Cyclamats.

Es gibt also sicher starke und schwache Cyclohexylaminbildner. Wahrscheinlich liegt dies daran, daß die für die Absprengung der SO_3 -Gruppe notwendigen Enzyme bei den einzelnen Tieren und auch am Menschen in verschiedenen Mengen zur Verfügung stehen. Da bisher der Cyclohexylaminnachweis meist nur im Urin erfolgte, muß angenommen werden, daß bis zur Abfiltrierung im Harn stets ein nicht bekannter Prozentsatz des Süßstoffes zwar in Cyclohexylamin umgewandelt wurde, dieses jedoch wiederum zu Cyclohexanol und Cyclohexanon umgewandelt wurde (die beiden letzten Verbindungen sind pharmakologisch weitgehend inert).

Man kann also auch sagen, daß es starke und schwache Cyclohexylamin-Ausscheider gibt, wobei das Kriterium das wäre, wie schnell der Organismus das Cyclohexylamin abbaut.

Die Frage, wie weit das gesundheitliche Risiko bei der Aufnahme von Cyclamat als Süßstoff geht, ist zunächst so zu beantworten, daß die Aufnahme von 3 - 4 g täglich, aufgeteilt in die üblichen kleinen Süßstofftabletten, wie sie etwa der Diabetiker einnimmt, sicherlich schadlos vertragen werden.

Tab. 16: Umrechnung der Cyclamatgaben im Tierversuch
auf 75 kg Mensch

Cyclamat in % des Futters	Cyclamataufnahme (in g pro kg Ratte/Tag)	entspr. Cyclamataufnahme (in g pro kg Mensch/Tag) Sicherheitsfaktor=100
1	0.71	0.53
2	1.46	1.09
4	2.85	2.13
8	6.67	4.99

In der Tabelle 16 sind gegenübergestellt:

- 1) In unseren Tierversuchen gewählte Cyclamatgaben (% im Futter)

- 2) Cyclamatgabe pro kg Ratte pro Tag
- 3) die den in den Tierversuchen verwendeten Dosen entsprechende tägliche Cyclamataufnahme eines Menschen mit 75 kg Körpergewicht (unter Einbeziehung des Sicherheitsfaktor von 100).

Bei 1 % Cyclamatverabreichung traten bei unseren Versuchstieren keine Schäden auf. Dies läßt darauf schließen, daß etwa 0.53 g Cyclamat unbedenklich für Menschen sind. Bei 2 % Cyclamat in der Nahrung begannen bei einigen Tieren die Faeces weich zu werden, ein regelrechter Durchfall trat jedoch noch nicht auf. Somit kann diese Gabe von 2 %, die beim Menschen einer Tagesaufnahme von etwa 1.09 g entspricht, als toxische Grenzdosis angesehen werden. Bei 4 % Cyclamat im Futter zeigten die Tiere verstärkten Durchfall, geringere Gewichtszunahmen und verringerte Futterverwertung und hatten weiterhin leichtere Lebern und Nieren und wiesen Caecumvergrößerungen auf. Zuzüglich war ab 4 % Cyclamatgabe der Wasserverbrauch um 60 % gestiegen. 4 % Cyclamat im Rattenfutter entspricht einer täglichen Aufnahme von ca. 2.13 g Cyclamat durch den Menschen (bei Einbeziehung des Sicherheitsfaktors von 100). Auf Grund der Ergebnisse der Tierversuche kann eine Tagesaufnahme von etwa 5 g Cyclamat beim Menschen nicht mehr ohne weiteres als unbedenklich angesehen werden.

Die Dehnbarkeit des Begriffs "no toxic effect level" macht unserer Meinung nach speziell im Falle des Cyclamats, wie auch die Diskussion der Ergebnisse der Tierversuche zeigt, erhebliche Schwierigkeiten bei der Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit dieser Substanz. Welches sind die objektiven Maßstäbe für die Beurteilung, welche Teststoffdosis bereits toxisch ist und welche noch nicht? Hier ist der Auslegung breiter Spielraum gegeben.

Wenn mit der Einführung einer Begrenzung der Dosierung und einer Deklaration des Süßstoffes eine allgemeine Aufklärung Hand in Hand geht, dann dürften Schäden sicherlich vermieden werden.

Obwohl wir bei der Übertragung von tierexperimentellen ermittelten Werten auf den Menschen durch die oben gezeigte Überrechnung recht skeptisch sind, haben Selbstversuche an freiwilligen Versuchspersonen gezeigt, daß die experimentell gefundenen und für den Menschen errechneten Werte real sind. Wir fanden, daß 5.0 g/ die für etwa 70 kg schweren Menschen gerade noch toleriert werden. Bei 8 von 12 Versuchspersonen traten nach dieser Gabe bereits Diarrhoeen, und zwar in recht unangenehmer, spastischer Form auf. Wenn wir aber weiterhin berichten, daß nach 5.0 g/ die bereits 20 % unserer Versuchspersonen wegen gastro-intestinaler Beschwerden den Versuch aufgaben, dann zeigt dies, daß selbst 70 mg/kg täglich bereits über der von allen Menschen vertragenen Dosis liegt.

Man kann nun im Selbstversuch ermitteln, daß 3.5 g/ die jedoch sicher toleriert werden, insbesondere, wenn diese Menge in den üblichen kleinen Mengen, wie Süßstofftabletten im Handel sind, aufgenommen werden.

Dies würde heißen, daß wir eine ADI (acceptable daily intake) von maximal 50 mg/kg befürworten.

Für die Einführung einer derartigen Begrenzung sprechen nicht nur die in dieser Arbeit niedergelegten tierexperimentellen Befunde, sondern zugleich auch die im Selbstversuch von Jedermann nachkontrollierbaren Beobachtungen an menschlichen Versuchspersonen.

Wir halten den Süßstoff Cyclamat, ganz besonders wegen seiner guten Stabilität gegenüber Kochen und Backen, für die Anwendung am Stoffwechselkranken für unentbehrlich, müssen aber ganz nachdrücklich auf die Gefahren einer unkontrollierten Anwendung dieses Süßstoffes hinweisen.

Aus diesem Grunde ist es auch unerlässlich, daß für cyclamathaltige Diätetika und für die im Handel befindlichen Süßstofftabletten eine strenge Deklarationspflicht eingeführt wird.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Versuche an Ratten ergaben, daß der Süßstoff Cyclamat bei ad libitum Verfütterung oberhalb von Konzentrationen von 2 % (im Futter) zum Auftreten von wäßrigen Diarrhoeen führt. Gleichzeitig kommt es zu zentralnervösen Erregungszuständen, die durch das im intermediären Stoffwechsel gebildete Cyclohexylamin hervorgerufen werden.

Das Vergiftungsbild sowie der Sektionsbefund wird beschrieben. Bei dem letzteren erscheint für diesen Süßstoff besonders charakteristisch das Auftreten einer mächtigen Vergrößerung des Caecums nach Cyclamatgabe zu sein.

Ansteigende Cyclamatgaben vermindern die Geschwindigkeit des Wachstums, die Futteraufnahme wird reduziert und die Futterverwertung verschlechtert.

Der Hämoglobingehalt des Blutes wird durch Belastung des Organismus mit Cyclamat nicht beeinflusst.

Es wird empfohlen, den Süßstoff nur in genau deklarerter Form in den Handel zu bringen, eine tägliche Maximalgabe (ADI = 50 mg/kg) festzulegen und durch eine allgemeine Aufklärung vor einer Überdosierung den Konsumenten zu warnen.

G. TABELLENANGABE

Absolute Organgewichte (Versuch I)

Gruppenbezeichnung	Leber	Herz	Niere	Lunge	Milz	Caecum voll	Caecum leer
1) 12.43 100.0 2.4 19.2 +0.2 12.1 +0.4 +16.1	1.49 100.0 +0.2 12.1 +0.4 +16.1	2.55 100.0 +0.4 +16.1 +0.4 +16.1	2.75 100.0 +0.3 +10.2 +0.3 +10.2	0.88 100.0 +0.3 +28.4 +0.3 +28.4	2.61 100.0 +0.8 +29.2 +0.8 +29.2	0.81 100.0 +0.2 +18.5 +0.2 +18.5	0.82 100.0 +0.1 +17.0 +0.1 +17.0
2) 13.42 100.0 1.8 13.3 +0.2 +13.8 +0.1 +4.3	1.30 100.0 +0.2 +13.8 +0.1 +4.3	4.78 100.0 +0.1 +4.3 +0.1 +4.3	2.88 100.0 +0.9 +32.6 +0.9 +32.6	0.86 100.0 +0.3 +37.2 +0.3 +37.2	3.00 100.0 +0.7 +24.1 +0.7 +24.1	0.82 100.0 +0.1 +17.0 +0.1 +17.0	0.82 100.0 +0.1 +17.0 +0.1 +17.0
1 13.14 105.7 2.9 23.4 +0.3 +17.4 +0.6 +21.6	1.58 106.0 +0.3 +17.4 +0.6 +21.6	2.85 111.7 +0.6 +21.6 +0.6 +21.6	2.94 106.9 +0.8 +27.6 +0.8 +27.6	1.10 125.0 +0.4 +48.9 +0.4 +48.9	3.82 108.4 +0.7 +27.5 +0.7 +27.5	0.83 102.5 +0.2 +18.0 +0.2 +18.0	0.83 102.5 +0.2 +18.0 +0.2 +18.0
2 12.81 95.5 1.9 14.4 +0.3 +103.1 +0.4 +13.7	1.34 103.0 +0.3 +103.1 +0.4 +13.7	2.61 93.9 +0.4 +13.7 +0.4 +13.7	2.65 92.0 +0.6 +20.2 +0.6 +20.2	0.77 89.5 +0.3 +31.4 +0.3 +31.4	3.16 105.3 +0.2 +18.0 +0.2 +18.0	0.93 113.4 +0.2 +18.0 +0.2 +18.0	0.93 113.4 +0.2 +18.0 +0.2 +18.0
1 12.18 97.9 1.7 13.9 +0.2 +10.1 +0.3 +11.4	1.53 102.7 +0.2 +10.1 +0.3 +11.4	2.65 103.9 +0.3 +11.4 +0.3 +11.4	3.30 120.0 +0.7 +23.6 +0.7 +23.6	0.93 105.7 +0.3 +28.4 +0.3 +28.4	4.66 178.5 +1.1 +42.1 +1.1 +42.1	1.46 180.2 +0.6 +75.3 +0.6 +75.3	1.46 180.2 +0.6 +75.3 +0.6 +75.3
2 10.32 76.0 2.7 19.5 +0.2 +14.6 +0.3 +10.4	1.29 99.2 +0.2 +14.6 +0.3 +10.4	2.45 88.1 +0.3 +10.4 +0.3 +10.4	2.71 94.1 +0.6 +19.4 +0.6 +19.4	0.91 105.8 +0.4 +46.5 +0.4 +46.5	4.00 133.3 +0.8 +25.6 +0.8 +25.6	0.91 110.9 +0.4 +46.3 +0.4 +46.3	0.91 110.9 +0.4 +46.3 +0.4 +46.3
1 10.18 81.9 0.8 6.8 +0.3 +17.5 +0.3 +10.6	1.47 98.7 +0.3 +17.5 +0.3 +10.6	2.41 94.6 +0.3 +10.6 +0.3 +10.6	2.87 104.4 +0.5 +19.6 +0.5 +19.6	0.95 107.9 +0.2 +23.9 +0.2 +23.9	6.68 256.9 +1.5 +56.9 +1.5 +56.9	1.69 238.6 +0.3 +34.6 +0.3 +34.6	1.69 238.6 +0.3 +34.6 +0.3 +34.6
2 8.65 64.5 3.8 28.0 +0.2 +14.6 +0.3 +9.7	1.23 94.6 +0.2 +14.6 +0.3 +9.7	2.53 91.0 +0.3 +9.7 +0.3 +9.7	2.71 94.1 +0.3 +9.0 +0.3 +9.0	0.77 89.5 +0.4 +41.8 +0.4 +41.8	6.71 223.7 +2.4 +80.9 +2.4 +80.9	1.07 130.5 +0.2 +26.8 +0.2 +26.8	1.07 130.5 +0.2 +26.8 +0.2 +26.8
1 8.52 66.5 2.3 18.7 +0.2 +11.4 +0.4 +14.9	1.37 91.9 +0.2 +11.4 +0.4 +14.9	2.20 86.3 +0.4 +14.9 +0.4 +14.9	2.64 96.0 +0.6 +20.4 +0.6 +20.4	0.85 96.6 +0.3 +36.4 +0.3 +36.4	5.56 213.0 +1.2 +47.3 +1.2 +47.3	1.57 193.8 +0.3 +39.5 +0.3 +39.5	1.57 193.8 +0.3 +39.5 +0.3 +39.5
2 8.33 62.1 0.8 6.1 +0.2 +7.0 +0.3 +11.1	1.09 83.8 +0.2 +7.0 +0.3 +11.1	2.10 77.7 +0.3 +11.1 +0.3 +11.1	2.41 83.7 +0.5 +18.8 +0.5 +18.8	0.59 68.6 +0.2 +20.9 +0.2 +20.9	7.79 236.1 +3.9 +119.8 +3.9 +119.8	1.86 219.5 +0.4 +46.3 +0.4 +46.3	1.86 219.5 +0.4 +46.3 +0.4 +46.3
1 7.45 59.9 1.1 9.0 +0.2 +13.4 +0.3 +12.2	1.00 67.1 +0.2 +13.4 +0.3 +12.2	1.88 73.7 +0.3 +12.2 +0.3 +12.2	1.96 71.3 +0.6 +20.0 +0.6 +20.0	0.71 80.7 +0.3 +31.8 +0.3 +31.8	6.55 250.9 +4.6 +175.5 +4.6 +175.5	1.78 219.8 +1.2 +43.2 +1.2 +43.2	1.78 219.8 +1.2 +43.2 +1.2 +43.2
2 7.64 56.9 1.2 8.6 +0.2 +16.9 +0.4 +13.3	0.84 64.6 +0.2 +16.9 +0.4 +13.3	1.90 68.3 +0.4 +13.3 +0.4 +13.3	2.02 70.1 +0.6 +20.5 +0.6 +20.5	0.60 69.8 +0.3 +31.4 +0.3 +31.4	9.20 306.7 +2.8 +93.5 +2.8 +93.5	2.04 248.8 +0.6 +76.8 +0.6 +76.8	2.04 248.8 +0.6 +76.8 +0.6 +76.8

1) Vollernährte Gruppen (300 % Vit. Mischung II.)

2) Mangelernährte Gruppen (65 % Vit. Mischung I)

3) Mittelwert $\pm$ Standardabweichung innerhalb der Gruppe

4) Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, wenn die Kontrollgruppe = 100 % ist.

Absolute Organgewichte (Vers. II)

Gruppenbezeichnung	Leber	Milz	Niere	Caecum voll	Caecum leer
Ko	8.27 + 1.12 100.0 ± 13.1	0.59 + 0.13 100.0 ± 22.1	1.55 + 0.16 100.0 ± 10.3	3.82 + 0.73 100.0 ± 19.17	0.63 + 0.13 100.0 ± 19.9
A 1%	7.14 + 0.24 86.3 ± 2.94	0.54 + 0.17 90.4 ± 28.3	1.45 + 0.13 93.9 ± 8.59	4.41 + 0.26 115.4 ± 6.88	0.70 + 0.13 116.4 ± 21.1
B 2%	6.53 + 0.20 79.0 ± 2.44	0.51 + 0.15 86.2 ± 25.3	1.39 + 0.12 90.5 ± 7.44	5.65 + 1.71 147.8 ± 44.8	0.77 + 0.15 123.3 ± 24.6
C 4%	6.03 + 0.19 72.9 ± 2.41	0.47 + 0.17 78.5 ± 28.9	1.22 + 0.02 78.7 ± 1.49	10.61 + 3.49 277.5 ± 91.2	1.28 + 0.23 204.6 ± 36.5
D 8%	5.37 + 0.29 64.9 ± 3.49	0.44 + 0.09 73.9 ± 20.4	1.26 + 0.10 81.2 ± 6.47	10.19 + 1.87 266.6 ± 48.8	1.59 + 0.27 253.1 ± 42.9

1) Mittelwert ± Standardabweichung innerhalb der Gruppe

2) Mittelwert ± Standardabweichung, wenn die Kontrollgruppe = 100 % ist.

H. LITERATURVERZEICHNIS

1. AUDRIETH, L.F. u. M. SVEDA: J.Organic.Chem. 9, 96-101 (1944)
2. BALLINGER, R.A. u. L.C. LARKIN: Sugar y Azucar, S. 42-44 (1964)
3. BARNES, R.H., G. FIALA, B. MC GEHEE u. A. BROWN: J. Nutrition 64, 533 (1958)
4. BÄHRENS u. KÄRBER: Archiv. exper.Path.Pharmakol. 177, 379 (1935);
5. BEACHAM, L.M.: National Res. Council, Publ.Food and Nutrition, Board (Washington), H. 386 (1955)
6. BECK, K.M.: Food Technology 11, 156-158 (1957); Ref.: Z. Lebensm.Ünters.u.Forschg. 109, 283 (1956)
7. BOROS, E.: J.of American Med. Association, New York (1.11.1965)
8. BUNDESGESETZBLATT: Verordnung über diätetische Lebensmittel (20.6.1963)
9. BUNGARD, G.: Die Süßstoffe. Der Deutsche Apotheker. Artikel I, ersch.in Heft 4/67, S. 150-157, 19.Jahrg.
10. BUNGARD, G.: Die Süßstoffe. Der Deutsche Apotheker. Artikel II, ersch.in Heft 5/67, S. 204-206, 19.Jahrg.
11. BUNGARD, G.: Die Süßstoffe. Der Deutsche Apotheker. Artikel IVa, ersch.in Heft 9/67, S. 361-372, 19.Jahrg.
12. BUNGARD, G.: Die Süßstoffe. Der Deutsche Apotheker. Artikel IVb, ersch.in Heft 4/68, S. 133-140, 20.Jahrg.
13. BUNGARD, G.: Die Süßstoffe. Der Deutsche Apotheker. Artikel IVc, ersch.in Heft 8/68, S. 311-320. 20.Jahrg.
14. CANN, M.B.Mc., M.F. TRULSON u. S.C. STULB: J.Amer.Diet.Ass. 32, 327 (1956)
15. COLOMAN, L.L.: Nevada State Journal (5.9.1965)
16. ESCH, G.J. VAN: Dtsch.Leb.Rundsch. 62, 11, 342 (1966)
17. FITZHUGH, O.G. u. A.A. NELSON: Fed.Proc. 9, 272 (1950)
18. FITZHUGH, O.G., A.A. NELSON u. J.P. TRAWLEY: J.Amer.Pharm. Assoc. 40, 583 (1951)
19. FÖRSTER, H., H. MEHNERT u. H. FÖRSTER: Medizin u. Ernährung 6, 12, 279-286 (1965)
20. HERWYNEN, J.C. VAN: Voeding 23, 401-408 (1962)
21. HOFFMANN, D.: New York Herald Tribune (3.10.1965)
22. HOFMANN, H.: Pharmacologie des Cyclamates. C.E.F.S./C.S.C.; Reunion Scientifique, Paris, 4.-5-5Dec.1968

23. HÖTZEL, D.: Einfluß suboptimaler Versorgung mit B-Vitaminen auf die Belastungsfähigkeit des Stoffwechsels. (Schriftenreihe des Instituts für Ernährungswissenschaft I der Justus Liebig-Universität, Giessen 1962)
24. HÖTZEL, D.: Cyclamate in der Ernährung des Menschen (erschien in Ernährungsumschau 1967)
25. HÖTZEL, D. u. J. SÜLTEMEIER: Cyclamate. Verwendung, Stoffwechsel, Toxikologie. Ernährungsumschau 15, S. 189-192, 232-235 (1968)
26. ICHIBAGASE (Kumamoto): "Neueste Studien auf dem Gebiet des Stoffwechsels und der Toxikologie der Cyclamate. Paris, Dez. 1968
27. KASPER, H., F. KAMEL-LOTFI u. E. PEPPLER: Klin.Wschr. 41, 770-773 (1963)
28. KLEIN, G.: Mineralwasser-Ztg. 18, 766-770 (1965)
29. KREIS, H.: Die Toxizität der Benzoesäure in Abhängigkeit von der Zufuhr an Glycin und B-Vitaminen. Dissertation, Landw.Fak. Giessen 1965
30. MARQUARDT, P., H.G. CLASSEN u. M. SPÄTH: Arzneim.Forschg. (Drug.Res.) 18, 590 (1968)
31. MOLNER, J.G.: Lax Vegas Sun (2.9.1965)
32. NEES, P.O. u. P.H. DERSE: Nature 208, 81 (1965)
33. RICHARDS, R.K., J.D. TAYLOR, J.D. BRIEN u. H.O. DUESCHER: J. Amer.Pharm.Ass. 40, 1 (1951)
34. REYNIERS, J.A.: Proc. of the 3.Intern.Congress of Biochem., Brüssel 3, 458 (1955)
35. SEEGER, H.: Untersuchungen über die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Kombination von Neomycin, Bacitracin und Nystatin im Vergleich zur Sulfaguanidin bei Versuchen zur Entfernung des Darmes der weißen Ratte. Dissertation, Vet.med.Fak., Giessen 1967
36. SCHÖNBERGER, J.A., D.M. RIX, A. SAKAMATO, J.D. TAYLOR u. R.M. KARK: Amer.J.Med.Sci. 225, 551 (1953)
37. STRANDBERG, K., G. SEDWALL, T. MIDTVEDT u. B. GUSTAFSON: Biology and Medicine 121, 699 (1966)
38. WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik. 3.Aufl.Verlag VEB G.Fischer, Jena (1957)
39. WILLIAMS, R.T.: Detoxication Mechanismus. Chapman and Hall Ltd., 3. Aufl. 500 (1959)
40. OHNE VERFASSEN: Comparative test on sodium cyclamate as a sweetening agent. The Pharm.J. 569 (15.12.1962)

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. H.D. C r e m e r
für seine wissenschaftlichen Anregungen und für die
Beschaffung der für die Versuche notwendigen Räum-
lichkeiten und Einrichtungen danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H o f m a n n
für die vielen wertvollen Anregungen, Diskussionen und
wissenschaftlichen Beratungen.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. G. W i l m e s für
viele wertvolle Diskussionen.

LEBENS LAUF

Tierarzt István Valach -
Wanlo, Krs. Grevenbroich

14. 3. 1934 geboren als zweites Kind des Kaufmanns
István Valach in Szentendre/Ungarn
- 1941 - 1944 Besuch der Volksschule in Szentendre
21. Juni 1952 Reifeprüfung in Szentendre
- 1952 - 1954 Hilfsarbeiter in Budapest
- 1954 - 1957 als Wehrpflichtiger zur Ungarischen Volks-
armee eingezogen
- 1957 nach der Ung. Revolution nach Österreich
geflüchtet
- 1957 - 1963 Studium an der Tierärztlichen Fakultät der
Justus Liebig-Universität Giessen
24. Mai 1963 Tierärztliche Prüfung
- 1964 Approbation
- 1964 - 1969 als Assistent in Wanlo
- 1966 - 1969 als Doktorand am Institut für Ernährungs-
wissenschaft I in Giessen tätig

LEBENSLAUF

geboren als zweites Kind des Kaufmanns Leopold Völkel in Gersdorf/Thüringen	14. 3. 1894
Besuch der Volksschule in Gersdorf	1901 - 1904
Kaufmannslehre in Gersdorf	01. Jan. 1905
Hilfsarbeiter in Gersdorf	1905 - 1907
als Verkaufsleiter der Gersdorfer Volks- bank eingesetzt	1904 - 1907
nach der Ung.-Revolution nach Gersdorf geflohen	1907
Studium an der Friedrich-Wilhelms-Universität Berlin (Medizin) 1907	1907 - 1909
kleinrentliche Tätigkeit	01. Jan. 1909
Apprentiz	1909
als Assistent in Berlin	1909 - 1910
als Doktorand an der Friedrich-Wilhelms- Universität in Berlin tätig	1910 - 1912

